

**Septin- und Aktomyosindynamik
während der Zellteilung von *Ustilago maydis***

Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Christian Böhmer
aus Siegen

Marburg/Lahn
Januar 2009

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von April 2006 bis Oktober 2008 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Michael Bölker an der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie, Abteilung Genetik angefertigt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Michael Bölker

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch

Tag der mündlichen Prüfung: 06.03.2009

Zusammenfassung

Die Zytokinese stellt den abschließenden Schritt der Zellteilung dar, bei der die physikalische Trennung von Mutter- und Tochterzelle vollzogen wird. Für deren fehlerfreien Ablauf spielt das genaue zeitliche und räumliche Zusammenwirken von Septin- und Aktomyosinstrukturen eine entscheidende Rolle. Der dimorphe Basidiomycet *Ustilago maydis* vollzieht Zytokinese und Zelltrennung durch die sukzessive Ausbildung zweier Septen. Dabei ist die Aktivität der Proteinkinase Don3 und die der kleinen GTPase Cdc42 essentiell für die Ausbildung des sekundären Septums. Die Wirkung und das Zusammenspiel beider Proteine bei diesem Prozess waren bisher unbekannt.

Zentrales Ziel dieser Arbeit war es, die Dynamik der Septin- und Aktomyosinstrukturen während der Zellteilung von *U. maydis* zu studieren und deren Bedeutung für die Septierung zu verstehen. Durch Lokalisierung des Septins Cdc10 konnte gezeigt werden, dass bereits zu Beginn der Knospung eine Kragen-ähnliche Septinstruktur (*Collar*) zwischen der Mutter- und Tochterzelle erzeugt wird. Dieser Septincollar markiert die zukünftige Teilungsebene und rekrutiert zu Beginn der Zytokinese die septinspezifische Proteinkinase Gin4. Diese Kinase vermittelt den vollständigen Abbau der Septinstruktur und erzeugt dadurch einen septinfreien Bereich, der die spätere Fragmentierungszone definiert. Unmittelbar neben diesem Bereich wurde die sukzessive Ausbildung neuer Septincollars beobachtet. Zunächst bildete sich ein primärer Septincollar auf der Seite der Mutterzelle und anschließend ein sekundärer auf der Seite der Tochterzelle. Beide Strukturen definieren den Ort der Septenbildung und erfüllen eine vergleichbare Funktion für die Ausbildung des primären bzw. sekundären Septums: Durch die Verwendung des FCH-Domänen-Proteins Cdc15 als fluoreszierender Marker konnte der Aufbau eines kontraktiven Aktomyosinrings am Ort des Septincollars beobachtet werden. Unmittelbar darauf erfolgt eine Umwandlung des Septincollars in einen Septinring. Während der anschließenden Kontraktion des Aktomyosinrings findet die Synthese des primären bzw. sekundären Septums statt.

Eine detaillierte Untersuchung der Septincollar-zu-Ring Umwandlung wurde durch den Einsatz einer analog-sensitiven Version der Don3 Kinase ermöglicht: Durch Inhibierung der modifizierten Kinase Don3^{M175A} war es möglich, Cluster von Zellen mit stabilem sekundären Septincollar zu erzeugen. Es konnte gezeigt werden, dass

diese Struktur als Gerüst für Cdc4 (*myosin essential light chain*) dient, einer weiteren Komponente des kontraktilen Aktomyosinrings. Interessanterweise führt die Reaktivierung der Kinase unmittelbar zu einem Abbau des zuvor stabilen sekundären Septincollars. Mit diesem Abbau geht die Rekrutierung von Cdc15 einher, welches zusammen mit Cdc4 den kontraktilen Aktomyosinring aufbaut. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Funktion des kontraktilen Rings Cdc15-abhängig und essentiell für den Wiederaufbau der Septinfilamente in Form eines Septinrings ist. Sowohl die primäre als auch sekundäre Septierung wird jeweils mit dem Abbau des Septinrings abgeschlossen. Es zeigte sich, dass der Abbau des sekundären Septinrings abhängig ist von Rts1, der regulatorischen Untereinheit der Proteinphosphatase 2A.

Die Wirkung und das Zusammenspiel von Don3 und Cdc42 konnten durch deren sequentielle Aktivierung und Inaktivierung aufgeklärt werden. Beide Proteine sind in zwei unabhängigen Signalkaskaden an der Assemblierung des sekundären Aktomyosinrings beteiligt.

Mit diesen Ergebnissen konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass der Wechsel der Septinstrukturen nicht durch eine mechanische Rotation der Septinfilamente in der Ebene der Plasmamembran stattfindet, sondern durch einen Abbau und Wiederaufbau vollzogen wird. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Septinfilamente eine duale Funktion in knospenden Pilzen übernehmen. Longitudinal ausgerichtete Filamente gewähren die mechanische Stabilität der Knospungsstelle und wirken als Interaktionspartner oder Zielproteine für weitere Proteine wie z.B. die Proteinkinase Gin4 oder für Komponenten des kontraktilen Aktomyosinrings. Diese Struktur wiederum wird für die Assemblierung von umlaufend ausgerichteten Septinfilamenten benötigt, die dann eine essentielle Funktion während der Zelltrennung ausüben.

Abkürzungen und Fachbegriffe

Abb.	Abbildung
as	analog-sensitiv
ATP	Adenosintriphosphat
CRIB	Cdc42 and Rac interactive binding
C-Terminus	Carboxyterminus
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DIC	differential interference contrast
FCH	Fer-CIP4 homology
Fig.	Figure
GEF	guanin nucleotide exchange factor
GFP	green fluorescent protein
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
kDa	KiloDalton
M157A / M157G	Aminosäureaustausch an Position 157 von Methionin nach Alanin/Glycin
NA-PP1	4-amino-1-tert-butyl-3-(1'-naphthyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidin
PAK	p21-activated kinase
RFP	red fluorescent protein
PP2A	Proteinphosphatase 2A
SIN	septation initiation network
TRITC	Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate
UV	Ultraviolett
wt	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abkürzungen und Fachbegriffe	III
Inhaltsverzeichnis	IV

1. Einleitung	1
1.1. Zytokinese	1
1.2. Zytokinese in Pilzen	1
1.2.1 Der Aktomyosinring	3
1.2.2 Die Familie der Septin-GTPasen	4
1.3. Zytokinese in <i>Ustilago maydis</i>	7
1.3.1 Septine und Aktomyosin während der Zellteilung in <i>U. maydis</i>	9
1.4. Die chemisch-genetische Methode	10
1.5. Zielsetzung der Arbeit	13
2. Ergebnisse	14
2.1. Cdc42 und die Ste20-ähnliche Kinase Don3 regulieren unabhängig voneinander die Zytokinese in <i>Ustilago maydis</i>	14
2.2. Während der Septincollar-zu-Ring Umwandlung findet eine Auflösung der Septinstrukturen statt	23
2.3. Unveröffentlichte Daten (Manuskript in Bearbeitung)	32
3. Diskussion	42
3.1. Während der Zellteilung von <i>U. maydis</i> kommt es zur aufeinanderfolgenden Umwandlung zweier Septincollars in Septinringe	43
3.2. Während der Umwandlung des Septincollars kommt es zu einer transienten Auflösung der Septinstruktur	44
3.3. Don3 und Cdc42 wirken unabhängig voneinander in zwei getrennten Signalkaskaden	47
3.4. Don3 und Cdc42 sind essentiell für den Aufbau des sekundären Aktomyosinrings	49
3.5. Cdc15 ist essentiell für die Funktion des Aktomyosinrings	50
3.6. Der Septincollar dient als Gerüst für Cdc4 aber nicht für Cdc15	52
3.7. Modell der Septierung in <i>U. maydis</i>	52
3.8. Die Proteinkinase Gin4 bestimmt die Positionierung der Septen durch die Ausbildung eines septinfreien Bereichs	54
3.9. Die regulatorische Untereinheit der Proteinphosphatase 2A, Rts1, reguliert den Abbau des sekundären Septincollars	58
3.10. Ausblick	60

4. Literaturverzeichnis	61
5. Anhang	68
5.1. Lebenslauf	68
5.2. Veröffentlichungen	69
5.3. Eidesstattliche Erklärung / Erklärung zum Eigenanteil	72
5.4. Danksagung	73

1 Einleitung

1.1 Zytokinese

In allen Organismen ist das Ziel der Zellteilung die Erzeugung zweier individueller Einheiten mit jeweils demselben Satz an Chromosomen, Organellen und Vesikeln. Nach der Mitose wird die Zellteilung durch die Zytokinese, unter der die physikalische Teilung des Zytoplasmas und der Zelle verstanden wird, abgeschlossen. Der Ablauf der Zytokinese ist in Pflanzen, Tieren und Pilzen konserviert und basiert auf dem Zusammenspiel von Mikrotubuli und Aktinstrukturen. Sogar Bakterien verwenden für die Durchführung der Zytokinese Vorläufer dieser Proteine, die durch das *ftsZ*- bzw. *ftsA*-Gen (*filamentous temperature-sensitive protein Z/A*) kodiert werden (Errington *et al.*, 2003). In Bakterien bilden diese Vorläuferproteine den sogenannten Z-Ring, der für die Rekrutierung weiterer für die Zytokinese essentieller Proteine benötigt wird (Shiomi *et al.*, 2007). In pflanzlichen Zellen wird die Teilungsebene durch das sogenannte Preprophasen-Band markiert. Während der Teilung bildet sich dort der Phragmoplast, eine dünne Struktur aus Mikrotubuli und Aktinfilamenten. An diesem wird durch Fusion von mit Zellwandmaterial gefüllten Vesikeln eine Zellplatte gebildet, die anschließend mit der Zellwand verbunden wird und so die Zytokinese ermöglicht (Smith, 2001). In nicht-pflanzlichen Eukaryoten variiert der Ablauf der Zytokinese, doch sind die grundlegenden Mechanismen und Komponenten konserviert. Nach Festlegung der Teilungsebene, bei der Mikrotubuli eine entscheidende Rolle spielen, wird ein kontraktile Ring bestehend aus einem Netzwerk von Aktin- und Myosinfilamenten aufgebaut und durch die Motoraktivität des Myosins kontrahiert. Dabei findet eine Invagination der Plasmamembran statt, da diese mit dem kontraktile Ring verbunden ist (zusammengefasst in Barr *et al.*, 2007). Die physikalische Trennung, auch *cell abscission* genannt, wird durch Membranfusionen und Umstrukturierungen vollzogen (Guertin *et al.*, 2002).

1.2 Zytokinese in Pilzen

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und die Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* stellen die beiden wichtigsten pilzlichen Modellorganismen zur Untersuchung

der bei der Zytokinese ablaufenden Prozesse dar. Neben den mit tierischen Zellen gemeinsamen Prozessen, benötigen Pilze für die Trennung der Mutter- und Tochterzelle die Synthese einer neuen Zellwand, die im Falle von Pilzen als Septum bezeichnet wird (Cabib *et al.*, 1989). Dabei unterscheiden sich *S. cerevisiae* und *S. pombe* hinsichtlich ihres Zellwachstums und der Positionierung ihrer Teilungsebene. Während die stäbchenförmige Spaltheefe an beiden Zellpolen wächst und ein vom Ort des Zellkern festgelegtes zentrales Septum zur Trennung der Zelle verwendet (siehe 1.2.1) (Chang *et al.*, 1996), wächst die runde Bäckerhefe durch Knospung. Die Teilungsebene, in der die Septierung stattfindet, wird hier bereits durch die Knospungsstelle selbst markiert (Chant, 1996; Tran *et al.*, 2001). In beiden Pilzen wird die Synthese eines primären Chitinseptums (Abb. 1, grün) durch die Kontraktion des Aktomyosinrings (Abb. 1, blau) und der damit einhergehenden Invagination der Plasmamembran (Abb. 1, braun) ausgelöst. Das Septum entsteht dabei zentripetal durch die Aktivität der Chitinsynthase II (Abb. 1, rot). Nach der Kontraktion des Aktomyosinrings wird die Zytokinese durch die Fusion der Plasmamembran abgeschlossen. Für die Trennung der über dieses primäre Septum noch verbundenen Zellen wird die Synthese sekundärer Septen benötigt. Diese werden sowohl in der Tochter-, als auch in der Mutterzelle durch Analgerung von Zellwandmaterial gebildet (Abb. 1, gelb). Anschließend bauen Chitinasen und Glukanasen das primäre Septum und Teile der angrenzenden Zellwand ab, was zur Trennung der Zellen führt (Zusammengefasst in Cabib, 2004). In *S. cerevisiae* kommen diese Enzyme ausschließlich von der Seite der Tochterzelle. Dadurch bleibt auf der Mutterzelle eine sogenannte Knospungsnarbe zurück (Colman-Lerner *et al.*, 2001).

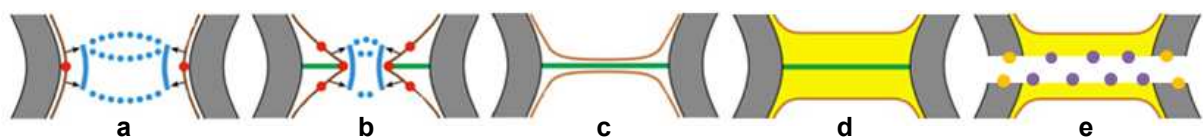


Abb. 1: Vereinfachtes Modell der Zytokinese und Zelltrennung in *S. cerevisiae*. a, In der Teilungsebene wird zunächst ein kontraktiler Aktomyosinring aufgebaut (blau). b, Während dessen Kontraktion findet die Invagination der Plasmamembran (braun) und die gleichzeitige zentripetale Synthese des primären Chitinseptums (grün) durch die Chitinsynthase II (rot) statt. c, Durch Fusion der Plasmamembran wird die Zytokinese abgeschlossen. d, Anschließend erfolgt die Synthese sekundärer Septen durch die Sekretion von Zellwandmaterial (gelb). e, Die Trennung der Zellen wird durch den Abbau des primären Septums und der angrenzenden Zellwand durch Chitinasen (lila) und Glukanasen (orange) vollzogen. Modifiziert nach Cabib, 2004.

1.2.1 Der Aktomyosinring

Der Aktomyosinring stellt eine komplexe Struktur dar, deren Aufbau und Kontraktion zur Invagination der Plasmamembran und damit einhergehend zur Trennung der Zellen führt (Abb. 1 und Abb. 2). Neben Aktin und Myosin wurden bereits mehr als 50 weitere Proteine identifiziert, die an diesem zeitlich und räumlich hoch regulierten Prozess beteiligt sind (Guertin *et al.*, 2002). Die Funktion dieser Proteine wurde intensiv in der Spalthefe *S. pombe* untersucht (Feierbach *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2006). Dabei zeigte sich, dass die linearen Aktinfilamente des kontraktiven Rings durch das Formin Cdc12 und das Profilin Cdc3 polymerisiert werden. Eine Verzweigung der Filamente durch den Arp2/3 Komplex findet dabei nicht statt (Wu *et al.*, 2006). Das Motorprotein Myosin ist vom Typ II und besteht aus einer schweren Kette, dem Myo2, und zwei leichten Ketten, der regulatorischen und der essentiellen Komponente Rlc1 und Cdc4 (Wu *et al.*, 2006). Obwohl Aktin und Myosin während der Kontraktion zusammenwirken, ist ihre Lokalisierung in der Teilungsebene voneinander unabhängig. Myosin akkumuliert bereits in Abwesenheit von Aktinfilamenten in der Teilungsebene, ist jedoch ohne diese nicht in der Lage, einen kontraktiven Ring auszubilden (Naqvi *et al.*, 1999; Motegi *et al.*, 2000). In *S. pombe* wird die Positionierung des Aktomyosinrings durch das Anillin-ähnliche Protein Mid1 bestimmt. Dieses wird in der Meta- und frühen Anaphase vom Zellkern freigesetzt, assoziiert mit der Plasmamembran (Burgess *et al.*, 2005) und ist essentiell für die Lokalisierung weiterer Ringkomponenten (Wu *et al.*, 2006). In Pilzen wie der Bäckerhefe, die sich durch Knospung vermehren, übernehmen Septine die Funktion des in diesen Organismen nicht vorkommenden Anillins (siehe 1.2.2). Der genaue Zusammenbau der Komponenten zu einem funktionalen Ring wird kontrovers diskutiert. Während elektronenmikroskopische Untersuchungen einen sukzessiven Aufbau von nur einem Startpunkt aus demonstrieren (Kamasaki *et al.*, 2007), zeigen fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen eine synchrone Bildung über die gesamte Teilungsebene (Wu *et al.*, 2006; Vavylonis *et al.*, 2008).

Eine wichtige Komponente des kontraktiven Rings ist das FCH-Domänen-Protein Cdc15, das für die Stabilität des Rings während der Mitose und der späteren Kontraktion benötigt wird (Kitayama *et al.*, 1997; Balasubramanian *et al.*, 1998; Carnahan *et al.*, 2003; Wachtler *et al.*, 2006). Dabei geht Cdc15 gleichzeitig eine Bindung mit der Plasmamembran und dem Formin Cdc12 ein und koordiniert

vermutlich die Membrandynamik mit der Reorganisation von Aktinfilamenten (Aspenström *et al.*, 2006; Chitu *et al.*, 2007). Die Deletion von Cdc15, aber auch die von anderen Komponenten des kontraktiven Rings führt in der Regel zu einem Zytokinesedefekt und zur Letalität.

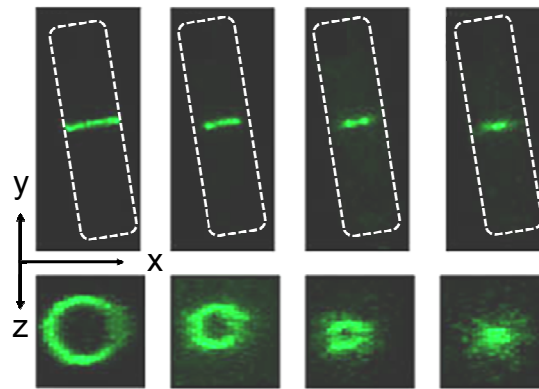


Abb. 2: Detektion des FCH-Domänen-Proteins Cdc15 aus *S. pombe* während der Kontraktion des Aktomyosinrings. Zur Durchführung der Zytokinese verwendet die Spaltheife *S. pombe* den zentralen Aufbau und Kontraktion eines Aktomyosinrings. Hier zeitlich von links nach rechts durch die Detektion von Cdc15-GFP dargestellt. Der Umriss der Zellen ist durch eine gestrichelte Linie dargestellt. Modifiziert nach Martin-Garcia *et al.*, 2006.

1.2.2 Die Familie der Septin-GTPasen

Neben dem Aktomyosinring spielen in Pilzen die Septine, die zur Familie GTP-bindender Proteine gehören, eine wichtige Rolle für den korrekten Ablauf der Septenbildung während der Zytokinese, aufgrund dessen sie ihre Bezeichnung erhielten (Longtine *et al.*, 1996). Septine wurden zuerst bei der Suche nach Zellzyklusmutanten der Bäckerhefe entdeckt (Hartwell *et al.*, 1970). Septinmutanten weisen starke Defekte in der Zelltrennung auf, wohingegen Knospung und Kernteilung normal verlaufen (Hartwell, 1971; Faty *et al.*, 2002). Septine zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, durch geordnete Selbstassemblierung Filamente und Ringe auszubilden (Abb. 3) (Field *et al.*, 1996; Mendoza *et al.*, 2002; Versele *et al.*, 2004; Versele *et al.*, 2004). Anders als Aktinfilamente und Mikrotubuli, besitzen Septinfilamente jedoch keine Polarität. Obwohl die Nukleotidbindung essentiell für die Polymerisierung ist, spielt die Hydrolyseaktivität keine entscheidende Rolle für die Funktion dieser GTPasen (John *et al.*, 2007; Sirajuddin *et al.*, 2007). Vielmehr scheint die Septindynamik über posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung (Tang *et al.*, 2002; Dobbelaere *et al.*, 2003) und Sumoylierung (Johnson *et al.*, 1999) reguliert zu

werden. Dabei konnten die Proteinkinasen Cla4, Gin4 und Cdc28 der Bäckerhefe, als Proteine identifiziert werden, deren Aktivität über die Phosphorylierung von Septinen eine entscheidende Rolle für die Regulation der Septindynamik spielt (Tang *et al.*, 2002; Dobbelaere *et al.*, 2003; Versele *et al.*, 2004). Aber auch die durch die regulatorische Untereinheit Rts1 vermittelte Dephosphorylierung von Septinen durch die Proteinphosphatase 2A führt zu einer veränderten Stabilität von Septinfilamenten (Dobbelaere *et al.*, 2003).

Das Genom der Bäckerhefe kodiert für fünf mitotische Septine, Cdc3, Cdc10, Cdc11, Cdc12 und Shs1 und zwei sporulationsspezifische, Spr3 und Spr28 (Ozsarac *et al.*, 1995; De Virgilio *et al.*, 1996). Die mitotischen Septine assemblieren in der späten G1-Phase zu einem Plasmamembran-assoziierten Ring, der die zukünftige Knospungsstelle markiert (Abb. 3, a + b) (Haarer *et al.*, 1987; Ford *et al.*, 1991; Cid *et al.*, 2001). Während der frühen Knospung findet aufgrund der Expansion der Plasmamembran die Umwandlung des Septinrings in eine Sanduhr-ähnliche Struktur statt, die auch als Septincollar bezeichnet wird (Abb. 3, c + d). Diese relativ starre Struktur markiert die spätere Teilungsebene am Übergang zwischen Mutter- und Tochterzelle und dient dabei vermutlich als *Scaffold* (Gerüst) für weitere an der Zytokinese beteiligte Proteine, u.a. für Komponenten des kontraktilen Aktomyosinrings. Während der Zytokinese teilt sich der Septincollar in zwei getrennte Septinringe, die zusammen einen septinfreien Bereich begrenzen, in dem die Kontraktion des Aktomyosinrings und die Fusion der Plasmamembran stattfindet (Barral *et al.*, 2000; Dobbelaere *et al.*, 2004). Gleichzeitig dienen die Septinringe auch als Diffusionsbarrieren, die den freien Austausch von Proteinen sowohl der äußeren Kernhülle als auch der Plasmamembran zwischen Mutter- und Tochterzelle einschränken (Shcheprova *et al.*, 2008).

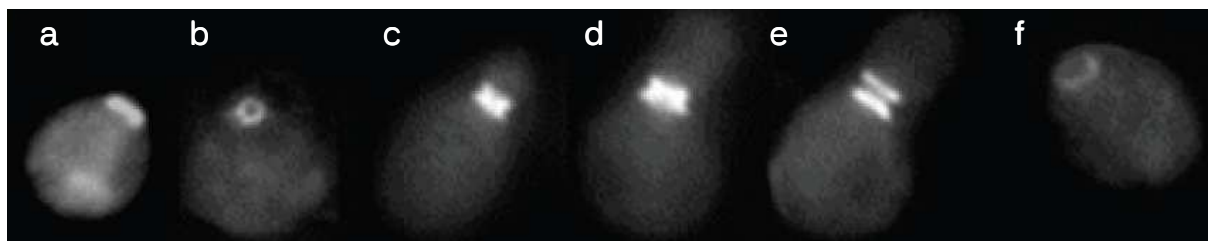


Abb. 3: Septindynamik in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* während des vegetativen Wachstums. **a + b**, Ein Plasmamembran-assoziiierter Septinring markiert die zukünftige Knospungsstelle. **c + d**, Durch Expansion der Plasmamembran wird der Septinring in eine Sanduhr-ähnliche Struktur (*Collar*) überführt. **e**, Während der Zytokinese wird der *Collar* in zwei getrennte Septinringe geteilt. **f**, Nach der Trennung der Zellen bleibt je ein Septinring in den separierten Zellen zurück. Modifiziert nach Weirich *et al.*, 2008.

Durch Fluoreszenzmikroskopie unter der Verwendung von polarisiertem Licht konnte mit Hilfe GFP-markierter Septine gezeigt werden, dass die Septinfilamente innerhalb des *Collars* longitudinal entlang der Mutter-Tochter-Achse ausgerichtet sind (Abb. 4). Während oder nach der Teilung in zwei getrennte Ringe, findet ein Übergang zu einer umlaufenden Orientierung statt (Abb. 4). Es wurde angenommen, dass diese Transition durch eine Rotation in der Ebene der Plasmamembran erfolgt. Deshalb wurde vermutet, dass die Septinfilamente eine mechanische Funktion während der Zytokinese ausüben (Vrabioiu *et al.*, 2006).

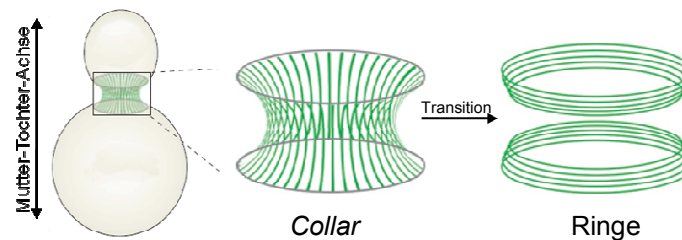


Abb. 4: 90° Rotation der Septinfilamente während der Zytokinese in *S. cerevisiae*. Septinfilamente innerhalb des *Collars* zeigen eine longitudinale Orientierung parallel zur Mutter-Tochter-Achse. Während des Übergangs (Transition) des *Collars* in zwei getrennte Ringe, nehmen Septinfilamente eine umlaufende Orientierung ein. Modifiziert nach Vrabioiu *et al.*, 2006.

In der Spaltheefe lokalisieren Septine, anders als in der Bäckerhefe, erst nach dem Aufbau des Aktomyosinrings in der Teilungsebene. Die Funktion der Hefeseptine, als Gerüst für Komponenten des Aktomyosinrings zu dienen, wird durch das Protein Mid1 erfüllt (Burgess *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006). Nach der Ausbildung des Aktomyosinrings kommt es zur Bildung eines Septinrings entlang dieser Struktur. Der Septinring übernimmt dann während der Umstrukturierung der Plasmamembran vermutlich dieselbe Aufgabe wie in der Bäckerhefe (Martin-Cuadrado *et al.*, 2005).

Außer in Pilzen kommen Septine auch in höheren Eukaryoten vor. Die Anzahl an Septingenen innerhalb eines Organismus variiert dabei stark, von nur zwei Septingenen im Genom von *Caenorhabditis elegans* bis hin zu 14 im Menschen (Nguyen *et al.*, 2000; Kinoshita, 2003; Hall *et al.*, 2005). Neben ihrer Funktion für die Zytokinese, übernehmen Septine in höheren Eukaryoten weitere Aufgaben bei der Positionierung der mitotischen Spindel (Kusch *et al.*, 2002; Grava *et al.*, 2006), beim polaren Wachstum (Barral *et al.*, 1999; Longtine *et al.*, 2000), der Exozytose (Hsu *et al.*, 1998) und der Apoptose (Larisch *et al.*, 2000).

1.3 Zytokinese in *Ustilago maydis*

Obwohl die grundlegenden Mechanismen der Zytokinese in Pilzen hochkonserviert sind, gibt es aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsformen Variationen in der Beteiligung und Koordination bestimmter Proteine. Diese Unterschiede ermöglichen jedoch weitere Rückschlüsse über die Funktion einzelner Proteine und den prinzipiellen Ablauf der Zytokinese. Ein wichtiger Modellorganismus für zellbiologische Fragestellungen ist der dimorphe Basidiomycet *Ustilago maydis* (Steinberg *et al.*, 2008). Dieser vermehrt sich im haploiden Stadium vegetativ durch Knospung, ähnlich wie die Bäckerhefe. Der Ablauf und das Prinzip der Zytokinese und Zelltrennung unterscheiden sich jedoch deutlich. Daher eignet sich dieser Pilz besonders für eine vergleichende Analyse von Proteinen und Strukturen, die an diesen Prozessen beteiligt sind.

Die Knospung von *U. maydis* findet alternierend an beiden Zellpolen durch apikales Spitzenwachstum der neugebildeten Zellwand statt (Jacobs *et al.*, 1994; Banuett *et al.*, 2008). Während der Mitose bewegt sich der Zellkern in die neu gebildete Knospe, wo seine Teilung stattfindet. Anschließend wandert einer der neugebildeten Kerne zurück in die Mutterzelle (Banuett *et al.*, 2002). Durch die sukzessive Ausbildung zweier Septen, wird abschließend die Zytokinese und die Trennung der Zellen vollzogen (Weinzierl *et al.*, 2002). Dabei wird das primäre Septum zwischen Mutter- und Tochterzelle eingezogen (Abb. 5, Sternchen), und das sekundäre innerhalb der Tochterzelle gebildet (Abb. 5, Pfeilkopf). Zusammen begrenzen die neugebildeten Septen eine mit Vakuolen gefüllte Fragmentierungszone, in der durch Lyse der verbindenden Zellwand die Trennung der Zellen stattfindet (O'Donnell *et al.*, 1984).

Es konnten lebensfähige UV-Mutanten isoliert werden, die spezifisch in der Ausbildung des sekundären Septums gestört waren (Abb. 5). Dies führt zu einem Zelltrennungsdefekt und zur Ausbildung großer Cluster von Zellen, deren Zytoplasma nur durch das primäre Septum getrennt ist. Die molekulare Charakterisierung dieser Mutanten ergab, dass es sich dabei um die kleine GTPase Cdc42, ihren Aktivator Don1 und die Ste20-ähnliche Kinase Don3 handelt (Weinzierl *et al.*, 2002; Mahlert *et al.*, 2006). Da diese Mutanten nicht letal sind und auch nicht in der Durchführung der Mitose gestört sind, eignen sie sich besonders zur Untersuchung der molekularen Mechanismen, die an der pilzlichen Septierung beteiligt sind.

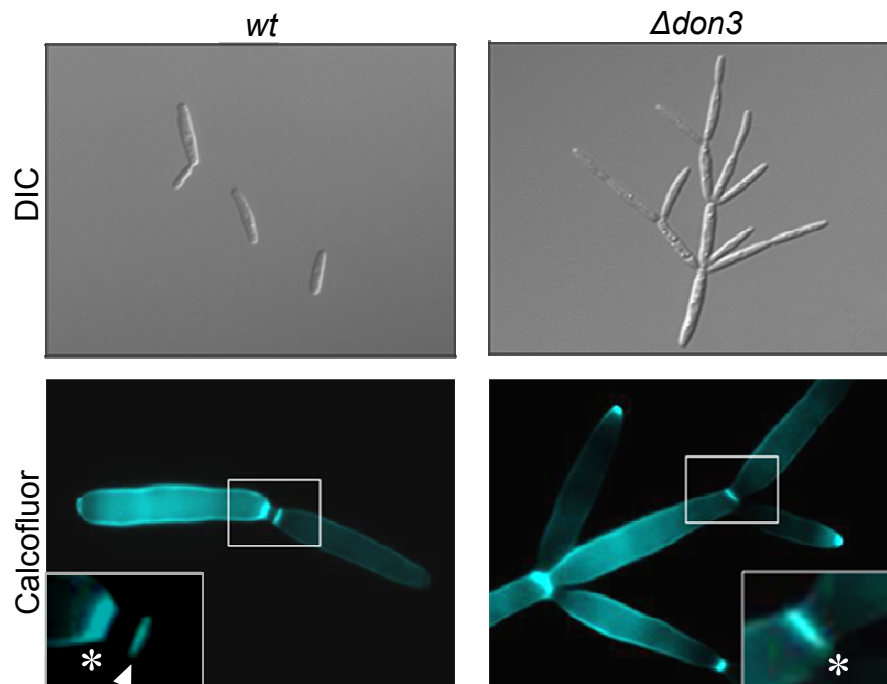


Abb. 5: Zelltrennungsmutanten in *U. maydis*. Die Zytokinese und Zelltrennung in haploiden Sporidien wird durch die sukzessive Ausbildung zweier Septen vollzogen (*wt*). Die Synthese des primären Septums (Sternchen) findet in der Knospungsstelle statt. Für die Ausbildung des sekundären Septums innerhalb der Tochterzelle (Pfeilkopf), wird die Aktivität der kleinen GTPase Cdc42, ihres Aktivators Don1 und der *germinal centre* Kinase Don3 benötigt. Die Inaktivierung eines dieser Proteine führt zu einem Zelltrennungsdefekt und zur Bildung von Zellclustern (hier exemplarisch für $\Delta don3$ gezeigt).

Die Ste20-ähnliche Proteinkinase Don3 gehört zur Familie der *germinal centre* Kinasen (GCK), deren Mitglieder im Gegensatz zur verwandten Unterfamilie der *p21-activated* Kinasen (PAK), keine CRIB-Domäne (*Cdc42 and Rac interactive binding*) besitzen. Obwohl viele GCKs in unterschiedlichen Organismen beschrieben wurden, ist nur wenig über ihre Funktion und Regulation in zellulären Signalkaskaden bekannt (Dan *et al.*, 2001). Don3 ist verwandt mit der Sid1p Kinase aus *S. pombe*, einer essentiellen Komponente der SIN-Signalkaskade (Sandrock *et al.*, 2006; Krapp *et al.*, 2008), die die Septenbildung während der Zytokinese reguliert. Es konnte gezeigt werden, dass Don3 nicht nur an der sekundären Septierung, sondern auch an der Auflösung der Kernhülle während der Mitose beteiligt ist und somit eine duale Funktion in *U. maydis* ausübt (Sandrock *et al.*, 2006).

Die hochkonservierte, kleine GTPase Cdc42 wird zusammen mit ihrem spezifischen Guaninnukleotidaustauschfaktor (GEF, *guanine nucleotide exchange factor*) Don1 ebenfalls für die Ausbildung des sekundären Septums benötigt (Mahlert *et al.*, 2006).

Dabei konnte durch *in vitro* GEF-Assays eine hohe Spezifität von Don1 gegenüber Cdc42 gezeigt werden (Hlubek *et al.*, 2008). Während der Zytokinese lokalisiert Don1 an endosomalen Vesikeln, die von dem Motorprotein Kin3 an die Tochterseite des primären Septums transportiert werden (Schink *et al.*, 2008).

Cdc42 ist in den meisten Eukaryoten konserviert und wurde zuerst in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* beschrieben, wo es für die Polarisation des Aktinzytoskelett während der Initiation der Knospung und anschließend für den Wechsel vom apikalen zum isotrophen Wachstum während der Knospenbildung benötigt wird. Des Weiteren lokalisiert Cdc42 sowohl in der Bäcker- als auch in der Spaltheife kurz vor der Kontraktion des Aktomyosinings in der Teilungsebene (Merla *et al.*, 2000; Richman *et al.*, 2002). Es wurde vermutet, dass Cdc42 sowohl am Aufbau, als auch an der Kontraktion des Aktomyosinrings beteiligt ist und dabei sowohl Endozytose als auch gerichtete Membranfusionen reguliert (Coll *et al.*, 2007; Bielak-Zmijewska *et al.*, 2008). Anders als für *S. pombe* und *S. cerevisiae* beschrieben, ist Cdc42 für *U. maydis* nicht essentiell (Adams *et al.*, 1990; Miller *et al.*, 1994; Richman *et al.*, 1999; Weinzierl *et al.*, 2002). Daher wurde postuliert, dass Cdc42 in Ascomyceten wichtige Aufgaben der kleinen GTPase Rac1 übernommen hat, die wiederum in Ascomyceten nicht vorkommt (Mahlert *et al.*, 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass die konstitutiv aktive Variante Cdc42^{Q61L} den Phänotyp der Mutante *don1* aber nicht den von *don3*-Mutanten supprimieren kann (Mahlert *et al.*, 2006). Eine Überexpression von Don3 supprimiert weder $\Delta don1$ noch $\Delta cdc42$. Daher wurde vermutet, dass die kleine GTPase Cdc42 durch den GEF Don1 aktiviert wird und diese eventuell die Proteinkinase Don3 in ihrer Aktivität stimuliert (Böhmer, 2005). Eine unabhängige Wirkung von Don3 und Cdc42 in zwei getrennten Signalkaskaden kann jedoch ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

1.3.1 Septine und Aktomyosin während der Zellteilung in *U. maydis*

In *U. maydis* konnten Homologe der vier in *S. cerevisiae* vegetativ exprimierten Septine Cdc3, Cdc10, Cdc11 und Cdc12 identifiziert werden. Beschrieben war in *U. maydis* bislang nur das Septin Cdc11 (Boyce *et al.*, 2005). Die Deletion dieses Septins führt in haploiden Zellen zu einer zitronenförmigen Zellmorphologie. Weiterhin vollziehen diese Mutanten Zytokinese und Zelltrennung ohne die

Ausbildung einer Fragmentierungszone durch Einschnürung eines zentral ausgebildeten Septums (Abb. 6). Diese Ergebnisse zeigen somit eine wichtige Funktion des Septins Cdc11 für die Durchführung der normalen Zytokinese in *U. maydis*.

Eine Untersuchung von Aktomyosinstrukturen wurde bisher für *U. maydis* nicht durchgeführt. Lediglich die Lokalisierung von Aktinfilamenten wurde analysiert. Dabei konnte eine Akkumulation von Aktinpatches innerhalb der Teilungsebene beobachtet werden (Banuett *et al.*, 2002). Ob es sich dabei um die Ausbildung eines kontraktile Aktomyosinrings handelt, wurde allerdings nicht näher untersucht.

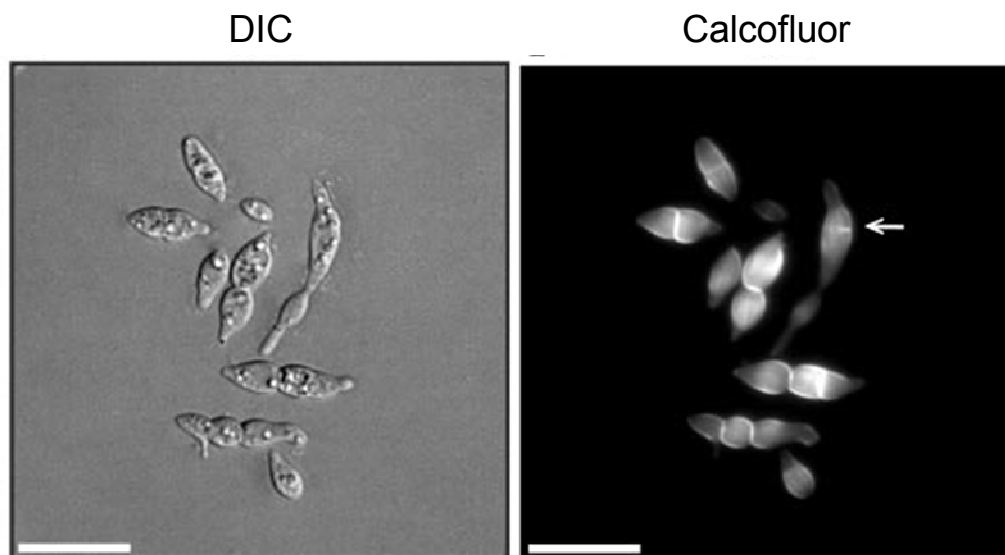


Abb. 6: *cdc11*-Deletionsmutanten in *U. maydis*. Haploide Zellen, denen das *cdc11*-Gen fehlt, zeigen eine zitronenförmige Zellmorphologie. Zytokinese und Zelltrennung vollziehen diese Zellen durch die Ausbildung eines einzelnen zentralen Septums (Pfeil), an dem sich die Zelle durch Einschnürung teilt. Modifiziert nach Boyce *et al.*, 2005.

1.4 Die chemisch-genetische Methode

Bei der Regulation biologischer Prozesse spielen Proteinkinasen eine entscheidende Rolle. Die Untersuchung bestimmter Kinasen ist dadurch erschwert, dass es nur in den seltensten Fällen möglich ist, eine Kinase mit Hilfe eines Inhibitors spezifisch zu hemmen. Deswegen ist man in der Regel auf die Erzeugung von Deletionsmutanten oder konditionalen Mutanten angewiesen, bei denen die Aktivität der Kinase durch die Temperatur oder über die Expression gesteuert werden kann. Temperatur-

sensitive Mutanten haben jedoch den Nachteil, dass Hitzestress nach Temperaturerhöhung zu starken sekundären Effekten führen kann (Causton *et al.*, 2001). Findet die Regulation einer Kinaseaktivität unter Verwendung eines regulierbaren Promotors statt, beobachtet man eine starke zeitliche Verzögerung der Kinase-abhängig regulierten Effekte. Zusätzlich kann das Fehlen einer Kinase andere Auswirkungen haben, als seine bloße Inaktivierung (Carroll *et al.*, 2001). Denn schon die spezifische Lokalisierung oder die Anwesenheit in einem Komplex kann neben der Kinaseaktivität eine regulatorische Rolle spielen. Außerdem können beim Fehlen einer Kinase möglicherweise verwandte Kinasen die Funktion übernehmen, insbesondere wenn die Kinase Teil eines größeren Proteinkomplexes ist. Daher stellt die Inhibierung einer Kinase durch einen spezifischen Inhibitor die genaueste Methode zur Untersuchung ihrer Funktion dar. Aufgrund der teilweisen hohen Homologie verwandter Kinasen gestaltet sich die Identifizierung von kleinen Molekülen, die einzelne Isoformen spezifisch und mit hoher Affinität inhibieren können, jedoch problematisch. Die Modellierung oder Vorhersage von Inhibitoren wird dadurch erschwert, dass die Bindungseigenschaft von Kinase und Inhibitor durch kleinste zelluläre Veränderungen beeinflusst wird. Für manche Kinasen wie z.B. Cdc28 und CDK2 sind durch chemische Synthese mehrere Kinaseinhibitoren synthetisiert worden. In einer *in vitro* Untersuchung von 28 kommerziell erhältlichen Inhibitoren konnte jedoch gezeigt werden, dass fast alle dieser Inhibitoren mehr als ein Zielprotein binden (Davies *et al.*, 2000).

Eine Alternative zur Synthese oder Identifizierung von spezifischen Inhibitoren stellt die chemisch-genetische Methode dar. Dabei werden Kinasen so mutiert, dass sie von einem vorgegebenen Inhibitor blockiert werden können (Bishop *et al.*, 2001). Experimente mit Serin/Threonin- und Tyrosinkinasen haben gezeigt, dass die Mutation einer einzelnen Aminosäure, des sogenannten „Gatekeepers“, in der ATP-Bindetasche ausreichend ist, eine Inhibitor-sensitive Kinase zu erzeugen. Dieser „Gatekeeper“ ist zumeist eine große, hydrophobe und vor allem hochkonservierte Aminosäure, die gegen eine kleine Aminosäure wie Glycin oder Alanin ausgetauscht wird, um so einen zusätzlichen Raum in der ATP-Bindetasche zu erzeugen. Modifizierte Inhibitoren, die aufgrund ihrer großen Seitenketten in diesen neuen Raum passen, können an die modifizierte ATP-Bindetasche binden (Abb. 7, links). Dagegen wird in Wildtypkinasen die Bindung des eingesetzten Inhibitors durch die Anwesenheit der Gatekeeper-Aminosäure verhindert (Abb. 7, Mitte) (Bishop *et al.*,

1998; Bishop *et al.*, 1999; Bishop *et al.*, 2000). In den meisten Fällen hat eine solche Modifizierung der Kinasen keine Auswirkung auf deren sonstige Proteinstruktur (Witucki *et al.*, 2002) und damit auch nicht auf die Enzymaktivität (Liu *et al.*, 1998), Substratspezifität (Witucki *et al.*, 2002) und zellulären Funktionen (Bishop *et al.*, 1998; Bishop *et al.*, 2000; Weiss *et al.*, 2000; Carroll *et al.*, 2001). In einigen Fällen ist es zu einer negativen Beeinflussung der Kinaseaktivität oder zu einer Inaktivierung der Kinase gekommen (Zhang *et al.*, 2005).

Als sehr selektiver Inhibitor mit hoher Affinität für derartig modifizierte Kinasen hat sich das ATP-Analog 1-Naphthyl-PP1 bewährt (Abb. 7, rechts). Wird die natürliche Kinase durch eine analog-sensitive (as) Version ersetzt, können nach Behandlung mit dem Inhibitor die direkten Folgen einer Inaktivierung der Kinase in Echtzeit analysiert werden. Dabei wird weder die zelluläre Lokalisierung der Kinase noch die ihrer Interaktionspartner bzw. Substrate beeinflusst (Bishop *et al.*, 2001). Auch kann wegen der Anwesenheit der analog-sensitiven Kinase keine Suppression der Kinaseaktivität durch verwandte Kinasen erfolgen. Neben der Bindung des spezifischen Inhibitors, ermöglicht die Modifizierung der Kinase außerdem eine Verwendung von N⁶-modifizierten ATP-Varianten, wie z.B. N⁶-Benzyl-ATP, als Phosphatdonor. Der Einsatz dieser Moleküle ermöglicht in Kinase-Assays die spezifische Phosphorylierung von Substraten auch in Gegenwart von vielen anderen Kinasen, weil diese das ATP-Analogon nur mit sehr viel geringerer Affinität als Substrat benutzen können.

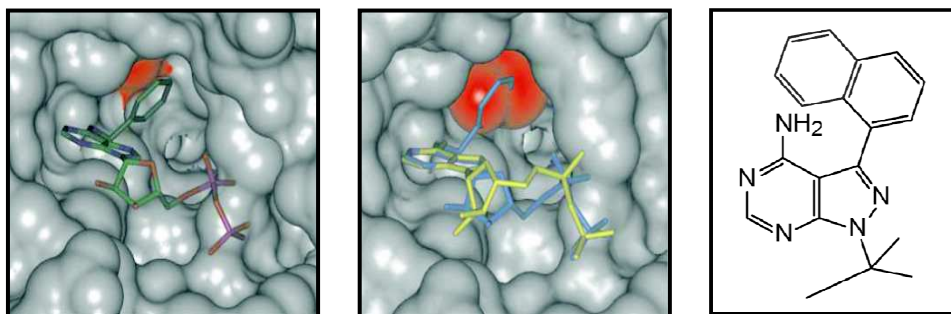


Abb. 7: Inhibierung einer analog-sensitiven Proteinkinase. Dargestellt ist die ATP-Bindetasche in ihrer natürlichen (links) und modifizierten (Mitte) Form. Das verwendete ATP-Analogon 1-Naphthyl-PP1, rechts dargestellt, bindet lediglich in der erweiterten ATP-Bindedomäne der modifizierten Kinase (links), nicht aber in der der Wildtypkinase (Mitte). Die Modifizierung wird durch einen Austausch der sogenannten „Gatekeeper“-Aminosäure (rot) durch eine kleine Aminosäure wie Alanin oder Glycin erzeugt. Modifiziert nach Böhmer, 2002.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe der chemisch-genetischen Analyse die Funktion der Don3 Proteinkinase aus *U. maydis* charakterisiert und ihr Zusammenspiel mit der kleinen GTPase Cdc42 bei der Ausbildung des sekundären Septums analysiert werden. Zentraler Punkt dieser Arbeit ist die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Septin- und Aktomyosindynamik während der Zellteilung von haploiden Sporidien. Dazu wurden fluoreszierende Fusionsproteine der Septine sowie von Komponenten des Aktomyosinrings hergestellt. Neben der Analyse wildtypischer Zellen, sollte die Auswirkung der Inhibierung und Reaktivierung der Don3 Kinase auf die beobachtete Dynamik untersucht werden. Diese Studien können einen Beitrag dazu leisten, das Verständnis der Funktion und des Zusammenspiels von Septin- und Aktomyosinstrukturen während der Zytokinese zu verbessern.

2 Ergebnisse

2.1 Cdc42 und die Ste20-ähnliche Kinase Don3 regulieren unabhängig voneinander die Zytokinese in *Ustilago maydis*

Publikation 1:

Christian Böhmer, Maik Böhmer, Michael Bölker und Björn Sandrock; **Cdc42 and the Ste20-like kinase Don3 act independently in triggering cytokinesis in *Ustilago maydis***, *Journal of Cell Science*, 2008 Jan 15;121(Pt 2)

In dieser Veröffentlichung wurde eine chemisch-genetische Analyse durchgeführt, um die Funktion der Proteinkinase Don3 bei der Zytokinese von *Ustilago maydis* zu untersuchen. Dazu wurde durch Austausch der Aminosäure Methionin an der Position 157 gegen Alanin (M157A) bzw. Glycin (M157G) eine analog-sensitive (as) Version dieser Kinase erzeugt. Die Expression der analog-sensitiven Kinase erfolgte unter Kontrolle eines regulierbaren Promotors (Fig. 1, A und B). Dabei zeigte sich, dass der Austausch M157A im Gegensatz zu M157G die biologische Aktivität der Kinase nicht beeinflusst (Fig. 1, C). Daraufhin wurde die Mutation M157A in das endogene *don3*-Gen eingeführt und überprüft, ob die Aktivität der Kinase mittels des Inhibitors NA-PP1 *in vivo* inhibiert werden kann. Eine Konzentration von 1 μ M NA-PP1 im Medium führte zu einem Zelltrennungsdefekt und resultierte in der Ausbildung bäumchenartiger Zellcluster (Fig. 2, A). In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob es möglich ist, durch Entfernen des Inhibitors nachträglich die Ausbildung des sekundären Septums durch Aktivierung von Don3 auszulösen. Um die Ausgangszellen zu markieren, wurden die Zellen zunächst durch Inkubation mit einem nicht-membrangängigen Biotin-Reagenz (NHS-LC-Biotin) an ihren Zellwandproteinen kovalent markiert. Nach Entfernung des überschüssigen Biotin-Reagenz wurden die markierten Zellen für fünf Stunden unter Don3-inhibierenden Bedingungen kultiviert. In den entstandenen Zellclustern ist lediglich die älteste Zelle (Ausgangszelle) durch Biotin markiert. Durch fluoreszenzmarkiertes Avidin (TRITC) konnten diese unter UV-Licht detektiert und so von den neugebildeten Zellen unterschieden werden (Fig. 2, B; Rhodamine). 30 Minuten nachdem der Inhibitor aus dem Medium entfernt worden war, lagen alle markierten Zellen als Einzelzellen vor (Fig. 2, B; unten). Dies weist darauf hin, dass sich alle Tochterzellen nach

Aktivierung der Don3 Kinase von der Ausgangszelle abgelöst haben. Dies zeigt, dass es auch nachträglich möglich ist, durch die Aktivierung der modifizierten Don3 Kinase die Bildung des sekundären Septums zu initiieren und damit die Zytokinese und Zelltrennung zu vollenden.

Um zu untersuchen, ob die Don3 Kinase für die Regulation der Zelltrennung die kleine GTPase Cdc42 benötigt, wurde die analog-sensitive Version der Don3 Kinase in eine konditionale Cdc42-Mutante eingeführt. In diesem Stamm ist es möglich, zum einen die Aktivität der Don3 Kinase durch den Inhibitor NA-PP1 und zum anderen die Expression der GTPase Cdc42 über die Kohlenstoffquelle getrennt voneinander zu regulieren. Zunächst wurde dieser Stamm unter Cdc42-reprimierenden Bedingungen kultiviert. Die entstandenen Zellcluster wurden mit Biotin markiert und nach Zugabe von NA-PP1 für 90 Minuten unter Don3-inhibierenden und Cdc42-reprimierenden Bedingungen weiterkultiviert (Fig. 3, A). Dadurch wurde eine gleichzeitige Aktivität beider Proteine ausgeschlossen. Die anschließende Induktion von Cdc42 führte zu einer Zelltrennung in den Zellen, obwohl weiterhin die Aktivität von Don3^{M157A} durch NA-PP1 gehemmt war. Es konnten sich alle Zellen des Clusters trennen, in denen zu Beginn des Experimentes die Don3 Kinase aktiv war. Zellen, die erst nach der Inhibierung entstanden waren (nicht markierte Zellen), konnten keine Trennung durchführen (Fig. 3, A). Eine zeitlich umgekehrte sequenzielle Aktivierung von Cdc42 und Don3 führte dagegen nicht zu einer Zelltrennung. Dies lässt darauf schließen, dass die Aktivität der Don3 Kinase zeitlich vor der der kleinen GTPase Cdc42 benötigt wird, um die Synthese des sekundären Septums zu vollziehen.

Weiterhin wurde die zelluläre Lokalisierung von Don3 und Cdc42 in Abhängigkeit des jeweils anderen Proteins untersucht. Ein GFP-Cdc42 Fusionsprotein lokalisierte im Wildtyphintergrund an Vakuolen, am primären und auch am sekundären Septum. Sowohl in einer *don3*- als auch in einer *don1*-Mutante konnte keine Lokalisierung von Cdc42 am Ort des zukünftigen sekundären Septums beobachtet werden (Fig. 3, B). Somit ist diese Lokalisierung der GTPase direkt oder indirekt von Don1 und Don3 abhängig. Ein GFP-Don3 Fusionsprotein lokalisierte im Wildtyphintergrund ausschließlich während der Zytokinese innerhalb der Fragmentierungszone. In beiden Mutanten war diese Lokalisierung ebenfalls vorhanden und damit unabhängig von Don1 und Cdc42 (Fig. 3, B).

Außerdem wurde das *U. maydis* Homolog des FCH-Domänen-Proteins Cdc15 aus *S. pombe* durch GFP-Fusion als zellulärer Aktomyosinringmarker verwendet.

Während der Zytokinese ist Cdc15 in *S. pombe* ein essentieller Bestandteil des kontraktiven Aktomyosinrings. Es konnte gezeigt werden, dass in *U. maydis* die Ausbildung und Kontraktion eines Aktomyosinrings während der Bildung sowohl des primären als auch des sekundären Septums stattfindet (Fig. 4, oben). In Don3-inhibierten wie auch in Cdc42-reprimierten Zellen blieb die Ausbildung des sekundären Aktomyosinrings aus. Die Bildung des Aktomyosinrings am ersten Septum war dagegen nicht gestört (Fig. 4, unten). Durch nachträgliche Aktivierung von Don3 bzw. Expression von Cdc42 wurden die Ausbildung und die Kontraktion des Aktomyosinrings am sekundären Septum initiiert. Dies lässt darauf schließen, dass die Ausbildung des sekundären Aktomyosinrings direkt oder indirekt sowohl von Don3 als auch Cdc42 abhängig ist.

2.2 Während der Septincollar-zu-Ring Umwandlung findet eine Auflösung der Septinstrukturen statt

Publikation 2:

Christian Böhmer, Caroline Ripp and Michael Bölker; **Dispersal of septin filaments during transition from collar to ring-like structures**, *submitted to Curr Biol*.

In dieser Veröffentlichung wurde mittels direkter Fluoreszenzmikroskopie die Dynamik der Septin- und Aktomyosinstrukturen während der Zellteilung von *Ustilago maydis* untersucht. Als Marker dienten die fluoreszierenden Fusionsproteine des Septins Cdc10 und des FCH-Domänen-Proteins Cdc15, dass als Marker für den Aktomyosinring diente. Es wurde ein Stamm erzeugt, in dem beide Fusionsproteine jeweils unter Kontrolle ihrer natürlichen Promotoren exprimiert werden. Während der Entstehung neuer Knospen konnte die Ausbildung eines Septincollars beobachtet werden (Fig. 1, a und b). Dieser Septincollar wandelt sich während der Zytokinese in eine Ringstruktur um. Gleichzeitig findet die Ausbildung des primären Aktomyosinrings statt. Dieser lokalisiert direkt neben dem Septinring auf der Seite der Tochterzelle (Fig. 1, c). Während der Kontraktion des primären Aktomyosinrings bildet die Tochterzelle einen sekundären Septincollar (Fig. 1, d). Dieser wandelt sich ebenfalls, wiederum parallel zur Ausbildung und Kontraktion des sekundären Aktomyosinrings, in einen Septinring um (Fig. 1, e). Jeweils nach der Synthese des primären bzw. sekundären Septums verschwanden die erzeugten Septinringe.

Um herauszufinden in welcher Reihenfolge und Abhängigkeit die beobachtete Dynamik abläuft, wurde die sekundäre Septierung durch Inhibierung der Don3 Kinase blockiert. Dazu wurde in dem Stamm, der beide fluoreszierenden Markerproteine exprimiert, die analog-sensitive Version Don3^{M157A} eingeführt. Nach der Blockade von Don3^{M157A} durch Zugabe von NA-PP1 bildeten die Zellen im Bereich des sekundären Septums noch einen Septincollar aus, waren aber nicht mehr in der Lage, diesen in einen Ring zu überführen. Längere Inhibition resultierte in Zellclustern mit stabilen sekundären Septincollars (Fig. 2, Pfeilköpfe). Ein sekundärer Aktomyosinring konnte, wie bereits in Publikation 1 beschrieben, in den Don3-inhibierten Zellen nicht beobachtet werden. Nach Entfernung des Inhibitors fand sehr rasch ein vollständiger Abbau des Septincollars statt (Fig. 2, 5 min). Gleichzeitig bildete sich an derselben Stelle ein Aktomyosinring (Fig. 2, Sternchen).

Erst dann erfolgte der Wiederaufbau eines sekundären Septinrings und die anschließende Bildung eines Septums (Fig. 2, Pfeile + Calcofluor). Der Septinring war auch nach der Kontraktion des Aktomyosinrings noch für einige Zeit stabil (Fig. 2, 8-10 min). Diese komplexe Choreographie der Septin- und Aktomyosindynamik während der Zytokinese, konnte auch in einer Filmstudie bestätigt werden (Movie S1, Fig. S2).

Zusammenfassend zeigten diese Versuche, dass die Aktivität der Don3 Kinase essentiell für die Umwandlung des sekundären Septincollars zu einem Ring ist. Zudem demonstriert dieser Versuch, dass eine Umwandlung von Septinstrukturen nicht unbedingt auf einer mechanischen Rotation der Septinfilamente innerhalb der Ebene der Plasmamembran beruhen muss, wie dies für die Bäckerhefe postuliert wurde (Vrabioiu *et al.*, 2006), sondern auch durch deren Auflösung und Wiederaufbau stattfinden kann.

Da nach dem Verschwinden des Septincollars zunächst ein Aktomyosinring gebildet wurde, bevor sich der Septinring wieder ausbildete, wurde vermutet, dass eine Zerstörung von Aktinfilamenten durch Latrunculin A den Aufbau der Septinringe nach Entfernen des Inhibitors verhindern würde. Während die Stabilität des gebildeten Septincollars durch die Zugabe des Aktin Inhibitors Latrunculin A nicht beeinträchtigt wurde, bildeten sich nach Aktivierung der Don3 Kinase in Gegenwart von Latrunculin A keine sekundären Septinringe (Fig. S3).

Die Abhängigkeit des sekundären Septinrings von einer intakten Aktomyosinringstruktur konnte in einem weiteren Experiment bestätigt werden. Hierzu wurde die für die Kontraktion des Aktomyosinrings wichtige Komponente Cdc15 deletiert. *cdc15*-Deletionsmutanten zeigen einen Zelltrennungsdefekt und sind außerdem in der Verteilung der Zellkerne gestört (Fig. 3, a). Allerdings konnte in *cdc15*-Mutanten der Abbau eines transienten Septincollars beobachtet werden (Fig. 3, b). Nach dem Abbau des Collars erfolgte jedoch kein Wiederaufbau eines Septinrings. Die Expression der essentiellen leichten Kette von Myosin (GFP-Cdc4) als Marker für Aktomyosin zeigte interessanterweise die Bildung einer Ringstruktur, die mit dem beobachteten transienten Septincollar kolokalisiert. Allerdings fand auch nach dem Verschwinden des transienten Septincollars keine Kontraktion des Aktomyosinrings statt, vielmehr war diese Struktur stabil (Fig. 3, b).

Da in der *cdc15*-Deletionsmutanten Cdc4 mit dem Septincollar kolokalisiert, wurde die Dynamik von Cdc4 genauer untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Cdc4

in Don3-inhibierten Zellen, im Gegensatz zu Cdc15, bereits mit dem sekundären Septincollar kolokalisiert (Fig. 4, a). Nach Entfernung des Inhibitors wandelte sich die Cdc4-Struktur gleichzeitig mit dem Abbau des Septincollars in den kontraktilen Aktomyosinring um (Fig. 4, a). Auch unter natürlichen Bedingungen konnte eine transiente Kolokalisierung zwischen Cdc4 und Septincollar beobachtet werden (Fig. 4, b). Allerdings wurde während der Kolokalisierung von Cdc4 mit dem Septincollar zu keinem Zeitpunkt eine gleichzeitige Kolokalisierung mit Cdc15 beobachtet (Fig. 4, c; oben). Erst nach Überführung in den funktionalen kontraktilen Ring zeigten beide Ringkomponenten die gleiche Lokalisierung (Fig. 4, c; unten).

Aus diesen Daten konnte ein Modell der Septin- und Aktomyosindynamik während der Zellteilung von *U. maydis* erstellt werden. Dieses veranschaulicht, dass die Septierung in *U. maydis* mit dem Aufbau eines Septincollars beginnt. Dieser Septincollar dient als Gerüst für die Aktomyosinringkomponente Cdc4. Anschließend findet ein Abbau des Septincollars statt, woraufhin Cdc15 zusammen mit Cdc4 den kontraktilen Aktomyosinring ausbilden. Dieser dient wiederum als Gerüst für den Aufbau des Septinrings und wird nach vollzogener Kontraktion abgebaut (Fig. 4, d).

Dispersal of septin filaments during transition from collar to ring-like structures

Christian Böhmer, Caroline Ripp and Michael Bölker*

Department of Biology, Philipps-University Marburg, Karl-von-Frisch-Str. 8, D-35032 Marburg, Germany, *corresponding author

Summary

Septins are conserved GTP-binding proteins essential for cytokinesis in animal and fungal cells (Weirich *et al.*, 2008). The filament-forming septins were discovered in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* where they undergo a complex structural reorganization during budding growth. Septin filaments align in longitudinal orientation along the mother-bud axis and form an hourglass- or collar-like structure. During cytokinesis the septin collar is converted into two rings with circumferential orientation of filaments (Vrabioiu *et al.*, 2006). The observed rotation of septin filaments was considered as evidence for a mechanical function of septin reorganization during cytokinesis. However, the molecular mechanism of this dynamic structural transition is yet unknown. Here we could show that septin collar-to-ring transition in budding cells of the dimorphic fungus *Ustilago maydis* involves dispersal and reassembly of septin filaments. We used a chemical genetic approach to arrest dividing cells with a stable septin collar. We observed that at this stage the essential myosin light chain Cdc4 but not the FCH-domain protein Cdc15 is associated with the septin collar. Inhibitor release results in instantaneous dispersal of the septin collar, while Cdc4 recruits Cdc15 from the cytoplasm to form the contractile actomyosin ring. Reassembly of septin filaments into a ring-like structure occurred upon constriction of the actomyosin ring. Thus, the collar-shaped septin assembly serves as a scaffold for the actomyosin ring, which then guides the dynamic reorganization of septin filaments.

Ustilago maydis is a dimorphic fungus that grows in its haploid phase by yeast-like budding. Buds are formed at either end of the elongated cells. During mitosis the nucleus migrates into the daughter cell where nuclear division takes place (Banuett *et al.*, 2002). After one of the newly formed nuclei has been delivered back to the mother cell, cytokinesis and cell separation occur by two consecutive septation events. The primary septum is built at the mother-bud neck while the secondary septum is formed within the daughter cell. Both septation events involve formation of a contractile actomyosin ring, which contains the FCH (Fer/CIP4 homology) domain protein Cdc15 (Böhmer *et al.*, 2008). The fungal crosswalls delimit a vacuolated fragmentation zone at which cell separation occurs by lysis of the connecting cell walls (O'Donnell *et al.*, 1984). We have previously isolated viable mutants that are specifically affected in triggering secondary septum formation (Weinzierl *et al.*, 2002). Since mitosis is not affected these mutants are perfectly suited to study the molecular basis of septum formation. We could show that secondary septum formation is triggered by the Ste20-like protein kinase Don3 and requires the small GTPase Cdc42 (Mahlert *et al.*, 2006; Böhmer *et al.*, 2008).

Septin proteins were originally discovered in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* where they play a crucial role during bud formation and cytokinesis (Byers *et al.*, 1976; Versele *et al.*, 2005). Septin proteins are polymerizing GTPases that form nonpolar filaments both in vivo and in vitro (Frazier *et al.*, 1998; John *et al.*, 2007; Bertin *et al.*, 2008). During budding the septin filaments assemble at the mother-bud neck into an hourglass-shaped collar.

At cytokinesis, the septin collar is split into two rings between which septation occurs. It is still an open and interesting question how this transition is triggered during cytokinesis. Polarized fluorescence microscopy has revealed that septin filaments change their orientation by 90° during the transition from collars to rings (Vrabioiu *et al.*, 2006; Vrabioiu *et al.*, 2007). A recent study revealed that septin proteins are remarkably stable and are recycled during these dynamic transitions (McMurray *et al.*, 2008).

U. maydis contains four orthologues of the yeast septins Cdc3, Cdc10, Cdc11 and Cdc12 (Boyce *et al.*, 2005; Pan *et al.*, 2007). To follow septin and actomyosin dynamics we coexpressed in budding cells of *U. maydis* fluorescently labelled Cdc10-RFP and Cdc15-GFP under control of their endogenous promoters. We observed formation of an hourglass-shaped septin collar at the mother-bud neck directly after bud emergence (Fig. 1a, Cdc10-RFP). This collar remained stable until the bud had reached its final size (Fig. 1b). After nuclear division the septin collar underwent transition into a ring-like structure (Fig. 1c). At this stage a contractile Cdc15-containing actomyosin ring became visible at the daughter side of the septin ring (Fig. 1c, Cdc15-GFP). During constriction of the primary actomyosin ring (Fig. 1d, Cdc15), a secondary septin collar assembled in the daughter cell while the first septin ring was still visible (Fig. 1d, Cdc10). Formation of the secondary septum occurred by an identical mechanism as observed for the primary septum and involved both septin collar-to-ring transition and constriction of the actomyosin ring (Fig. 1e). Thus it appears that in *U. maydis* two rounds of septin collar-to-ring transitions are required for cytokinesis and cell separation.

Next we analyzed septin localization in cells that were blocked in cell separation by specific inhibition of an analogue-sensitive version of the Don3 protein kinase (Böhmer *et al.*, 2008). Cells treated with the inhibitor NA-PP1 formed clusters of unseparated cells connected by the primary septum (Fig. 2, NA-PP1, calcofluor). Interestingly, upon inhibition stable septin collars assembled at the sites of the future septum (Fig. 2, Cdc10, arrowheads). After release of Don3 kinase inhibition, secondary septum formation was initiated rapidly and calcofluor stainable crosswalls became visible in all daughter cells. Most remarkably, upon inhibitor release the septin collar was completely dispersed in less than 5 min (Fig. 2, Cdc10, 5 min). In the absence of any visible septin structure a Cdc15-containing actomyosin ring emerged (Fig. 2, Cdc15, asterisks). Reassembly of septin filaments into a ring-like structure was observed not earlier than 7 min after inhibitor release (Fig. 2, arrows). At this stage the contraction of the actomyosin ring started and deposition of cell wall material became detectable (Fig. 2, 7-8 min). While Cdc15-containing actomyosin structures disappeared after constriction the septin ring persisted for at least another 5 min (Fig. 2, 10 min and not shown). Septin dispersal and reassembly after release of inhibition was also followed by time-lapse fluorescence microscopy (see supplemental Movie S1 and supplemental Fig. S2). Thus, septin reorganization in *U. maydis* occurs by a dispersal/reassembly process rather than by mechanical rotation of stable septin filaments.

Figure 2 | Septin collar-to-ring transition involves dispersal of septin filaments. Cells expressing analog-sensitive Don3 kinase were blocked for 4 h by addition of the kinase inhibitor NA-PP1. Septin and actomyosin dynamics was followed by Cdc10-RFP and Cdc15-GFP fluorescence. Time points after release of kinase inhibition are indicated (5-10 min). Arrowheads indicate stable septin collars during inhibition. Within less than 5 min the septin collar disperses and is replaced by an actomyosin assembly (asterisks). At 7 min of inhibitor release a septin ring (arrows) is reassembled along the actomyosin structure. Cell wall deposition is shown by calcofluor white staining. Scale bars, 2.5 μ m (DIC) and 0.8 μ m (Fluorescent micrographs).

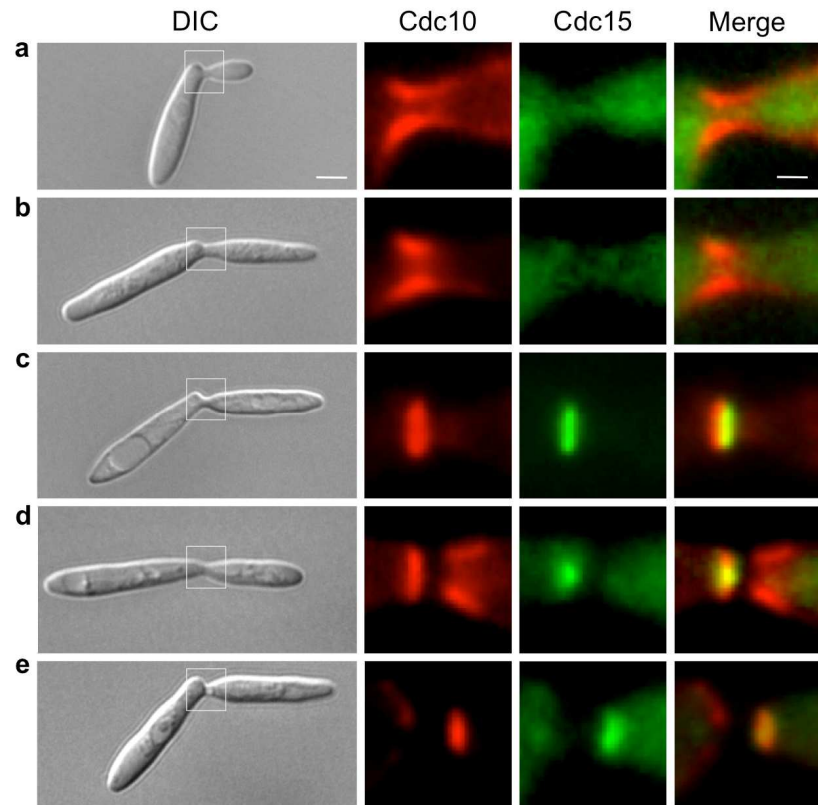
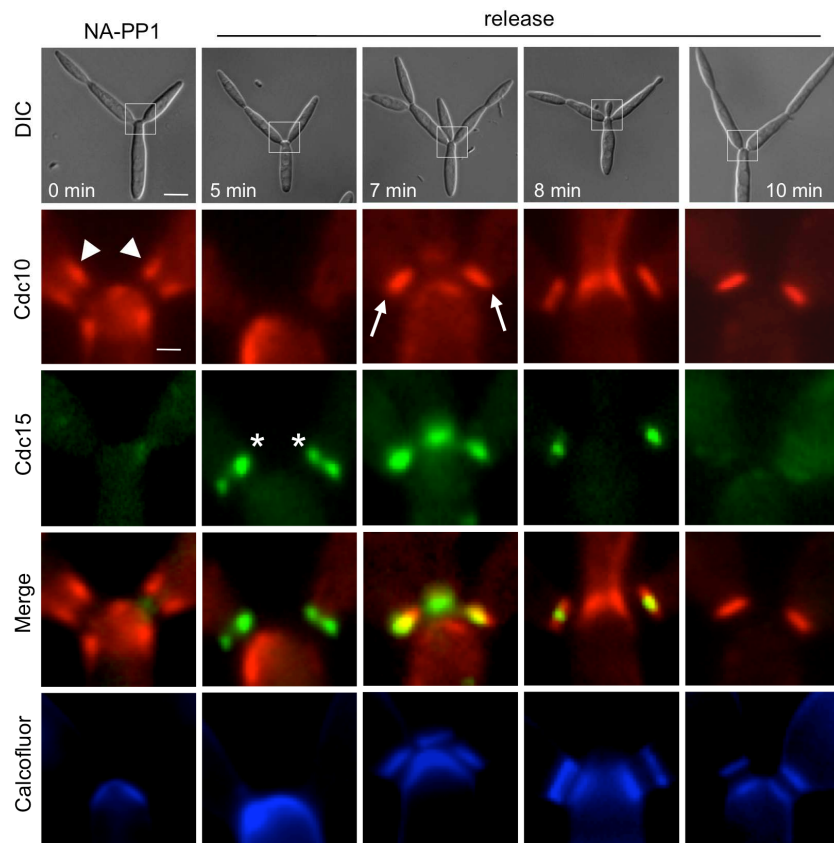


Figure 1 | Septin (Cdc10) and actomyosin (Cdc15) dynamics during budding of haploid *Ustilago maydis* cells. a-e, Cells expressing Cdc10-RFP and Cdc15-GFP under control of their endogenous promoters at different stages of the cell cycle. Scale bars, 2.5 μ m (DIC) and 0.8 μ m (Fluorescent micrographs).



The fact that actomyosin ring formation precedes septin ring formation suggests that septin reorganization might depend on a functional actomyosin ring. Therefore we examined whether addition of the actin inhibitor Latrunculin A did interfere with septin reassembly. Interestingly, Latrunculin A did not affect stability of the septin collar in cells inhibited for Don3 activity (Supplemental Fig. S3a). However both actomyosin ring formation and septin reassembly were completely abolished if Latrunculin A was added at inhibitor release (Supplemental Fig. S3b). This corroborates our notion that actomyosin ring assembly is prerequisite for septin reorganization. To further test this hypothesis, we generated a *cdc15* knockout mutant. Deletion of *cdc15* is not lethal in *U. maydis* but mutant cells displayed a previously undescribed phenotype. Cell separation is strongly affected and cells form chains of unseparated cells (Fig. 3a). Proper polar budding occurred only at the outermost cells i.e. only in young mother cells that gave rise to their first daughter cell. All further buds emerged at lateral sites resulting in new chains of cells (Fig. 3a). While nuclear distribution is normal in younger cells, older cells with one or more lateral buds often contained several nuclei that apparently had failed to migrate into the lateral buds (Fig. 3a). During budding of the outermost cells septin assemblies were observed at both the primary and secondary septum. Interestingly, these structures disappeared after a while, but were never reassembled (Fig. 3b). To follow actomyosin assembly in $\Delta cdc15$ mutants, GFP-Cdc4 was expressed in these cells under control of a constitutive promoter. Cdc4 encodes the essential light chain of conventional myosin-II and is an essential component of the F-actin contractile ring (McCollum *et al.*, 1995). In $\Delta cdc15$ mutant cells Cdc4 colocalized with the transient septin structures but remained stable after dispersal of septin filaments (Fig. 3b). Apparently, Cdc4 is able to form a stable assembly in the absence of Cdc15. This suggests that incorporation of Cdc4 into the contractile ring precedes that of Cdc15, similar to the situation in *S. pombe* (Wu *et al.*, 2003). However, in the absence of Cdc15 neither actomyosin constriction nor septin reassembly was observed. Together, these data support our hypothesis that a functional actomyosin ring is prerequisite for septin reassembly.

To study the dynamic organization of the contractile actomyosin ring in more detail we followed Cdc4 localization during cytokinesis and cell separation. In cells blocked for secondary septation by inhibition of Don3 kinase activity we observed a stable colocalization of Cdc4 with the septin collar (Fig. 4a). One has to point out that Cdc15 does not colocalize with the septin collar at this stage (see Fig. 2). This substantiates the notion that Cdc4 arrives earlier than Cdc15 during actomyosin ring formation. In addition, it strongly suggests that in the absence of Don3 kinase activity the septin collar serves as a scaffold for myosin-II but not for Cdc15. Quite remarkably, upon release of kinase inhibition Cdc4 was immediately reorganized into a ring-like structure while the septin collar completely dispersed in less than 5 min (Fig. 4a, supplemental Movie S1 and supplemental Fig. S2). Thus, our inhibitor release experiments demonstrate that collar-to-ring transition of Cdc4 and recruitment of Cdc15 to this ring structure both depend on Don3 activity, while assembly of Cdc4 at the septin collar was independent of Don3.

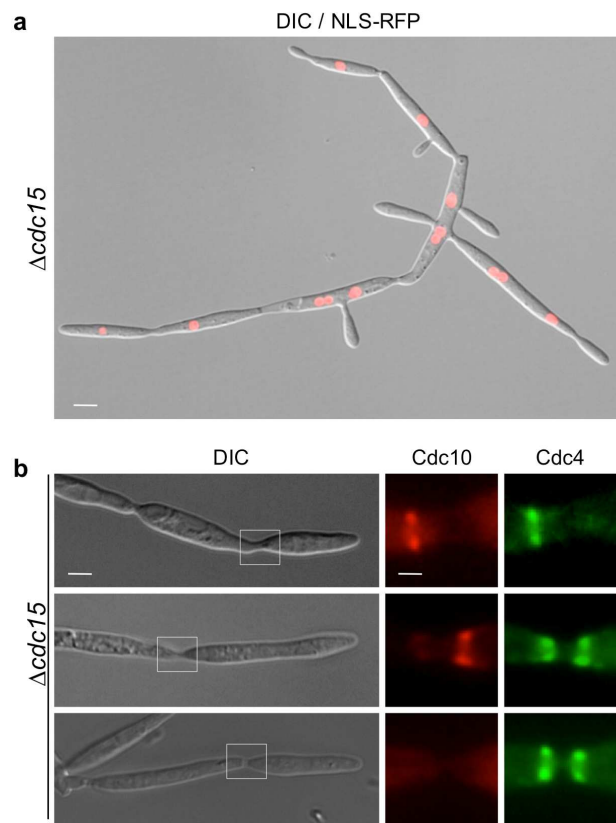


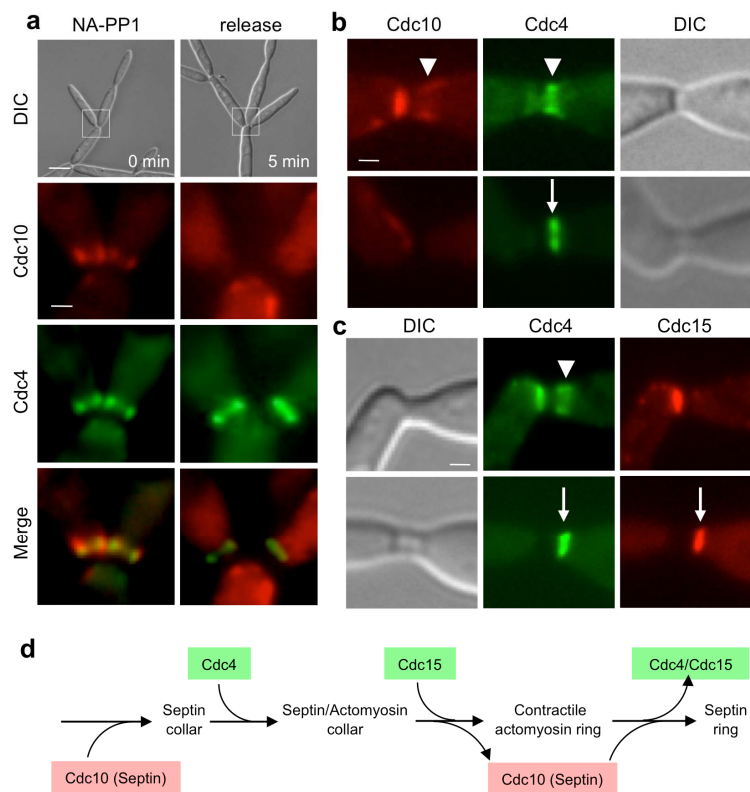
Figure 3 | Reassembly of septin filaments depends on the presence of the FCH-domain protein Cdc15. Deletion mutants for *cdc15* are viable but display cytokinesis and nuclear distribution defects. **a**, Polar budding occurs in outermost cells of $\Delta cdc15$ mutants. Older cells display lateral budding and are multinucleated (NLS-RFP). Scale bar, 4 μ m. **b**, During polar budding transient septin assemblies (Cdc10) are visible at both the primary and secondary septum. The essential myosin light chain Cdc4 colocalizes with both septin assemblies and remains stable even after septin dispersal. Scale bars, 2.5 μ m (DIC) and 0.8 μ m (Fluorescent micrographs).

Next we asked whether a similar choreography of septin and actomyosin structures also occurs in wild type cells. During formation of the secondary septum a collar-shaped Cdc4 assembly could be observed which colocalized with septin (Fig. 4b, upper panel). However at this stage Cdc4 did not colocalize with Cdc15 (Fig. 4c, upper panel). Upon dispersal of septin filaments Cdc4 was reorganized into a ring-like structure (Fig. 4b, lower panel). The Cdc4 ring now colocalized with Cdc15 (Fig. 4c) suggesting that both components had been incorporated into the contractile actomyosin ring.

Taken together our observations demonstrate that in *U. maydis* septin collar-to-ring transition is part of a dynamic process, which involves dispersal and reassembly of septin filaments (Fig. 4d). This is in sharp contrast to *S. cerevisiae* where it has been proposed that this transition occurs by mechanical rotation of septin filaments (Vrabiou *et al.*, 2006). Since this reorganization process is quite fast, it might be feasible that septin dispersal and reassembly has escaped detection in *S. cerevisiae*.

Interestingly, dividing cells of the fission yeast *S. pombe* form a septin ring only after formation of the contractile actomyosin ring (Wu *et al.*, 2003) as do mammalian cells (Kinoshita *et al.*, 2002). Therefore, we propose that distinct septin structures as observed in *S. cerevisiae* and *U. maydis* are characteristic for budding fungal cells that multiply by a budding process. We propose that septin filaments exert a dual function in these cells. Septin filaments in longitudinal orientation confer mechanical stability of the mother-bud neck while circumferential orientation of septin filaments is required for their function during cytokinesis. Since both septin functions obviously act independently of each other, transition between these conformations does not necessarily require mechanical rotation of the septin filaments.

Figure 4 | Sequential incorporation of Cdc4 and Cdc15 into the contractile actomyosin ring. **a**, Septin (Cdc10) and myosin (Cdc4) dynamics during secondary septum formation after release of Don3 kinase inhibition. Cdc4 colocalizes with the septin collar and undergoes collar-to-ring transition while septin is dispersed. Scale bars, 2.5 μ m (DIC) and 0.8 μ m (Fluorescent micrographs). **b**, Septin and myosin dynamics in wild type cells. Arrowheads indicate collar-like co-assembly of septin and Cdc4. The arrow indicates the Cdc4 ring after septin dispersal. Scale bars, 2.5 μ m (DIC) and 0.8 μ m (Fluorescent micrographs). **c**, Myosin and actomyosin dynamics in wild type cells. Cdc15 colocalizes with Cdc4 only in the ring structure (arrows) but not in the collar (arrowhead). Scale bars, 2.5 μ m (DIC) and 0.8 μ m (Fluorescent micrographs). **d**, Model of septin and actomyosin dynamics during septation.



Material and Methods

Strains. *Escherichia coli* strain DH5 α was used for cloning and amplification of plasmid DNA. The *U. maydis* strain Bub8 (Schulz *et al.*, 1990) was used as wild type background for all strains created in this manuscript. Bub8-don3^{M175A} carries an analogue-sensitive allele of *don3* and has been described previously (Böhmer *et al.*, 2008). Transformation of *U. maydis* was performed as described previously (Schulz *et al.*, 1990). A strain expressing Cdc15-GFP from its endogenous promoter has been described (Böhmer *et al.*, 2008). The constitutive *Petef*-promoter (Loubradou *et al.*, 2001) was used for expression GFP-Cdc4, Cdc15-RFP and NLS-RFP. The construct for expression of Cdc10-RFP under control of its endogenous promoter was generated as described previously for Cdc15 (Böhmer *et al.*, 2008). Bub8 Δ cdc15 was generated by homologous recombination using a PCR protocol (Kämper, 2004). All constructs were confirmed by sequencing. Sequences of primers and plasmids are available upon request.

Specific inhibition of Don3 kinase activity. The activity of the engineered kinase Don3^{M175A} was inhibited (for indicated time) by addition of 250 nM NA-PP1 (Calbiochem). Inhibitor release was performed by transfer into fresh medium.

Microscopy. *U. maydis* cells from logarithmically growing cultures were observed by differential interference contrast (DIC) and epifluorescence microscopy using a Zeiss Axiophot microscope. Calcofluor white staining was performed as described previously (Pringle *et al.*, 1989). For time-lapse experiments cells were immobilized on an agar pad containing non-fluorescent medium and 1.5% agarose. Image processing was carried out using Photoshop (Adobe).

Acknowledgements

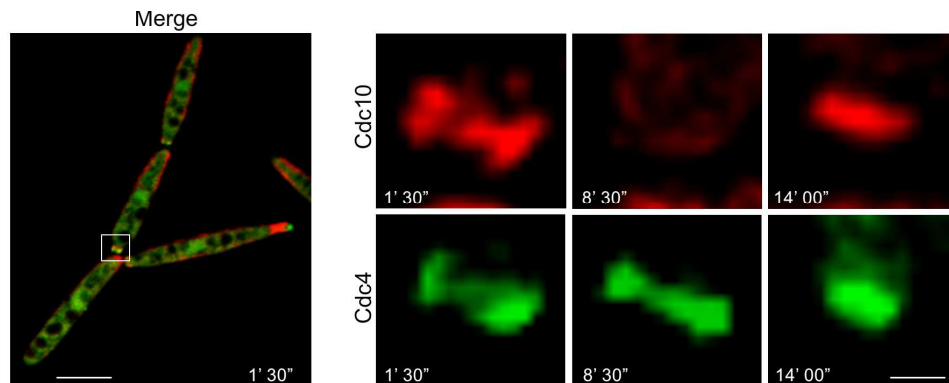
We thank J. Deacon for critical reading of the manuscript. C.B. is funded by Deutsche Forschungsgemeinschaft (GK 1216).

Author information.

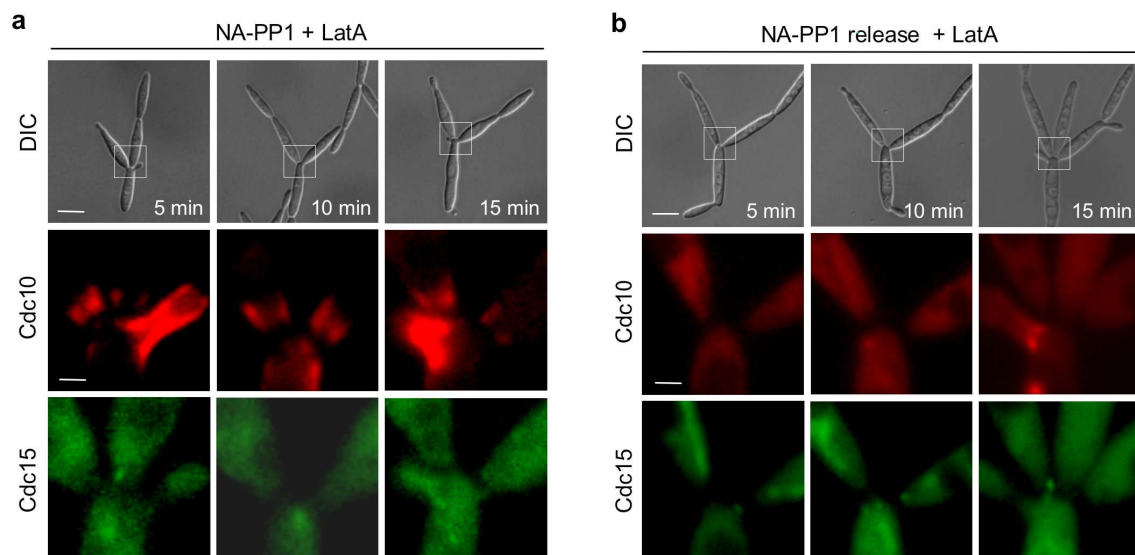
Correspondence and request for materials should be addressed to M.B. (boelker@staff.uni-marburg.de)

<http://www.students.uni-marburg.de/~Boehmerc/MovieS1.mov>

Supplemental Movie S1 | Time-lapse fluorescence microscopy reveals septin dispersal and reassembly during septation. Cells harbouring the analogue-sensitive version of Don3 kinase and coexpressing fluorescently labelled septin (Cdc10-RFP) and myosin light chain (GFP-Cdc4) under control of their endogenous promoters were blocked for 4 h by addition of NA-PP1. After release of inhibition (time point: 0) secondary septum formation was followed by time-lapse microscopy. Frames were taken every 30 seconds, speed: 10 frames per second (fps). Red channel: Cdc10-RFP (septin); green channel: GFP-Cdc4 (myosin light chain). <http://www.students.uni-marburg.de/~Boehmerc/MovieS1.mov>



Supplemental Figure S2 | Septin dispersal and reassembly during septation. Shown are frames from the supplemental Movie S1. The enlargements demonstrate that the hourglass-shaped septin accumulation (septin collar, time point 1' 30 ") is completely dissolved (time point 8' 30") during cytokinesis before it is reassembled into the ring-like structure (time point 14' 00"). Scale bars, 5 μ m, left panel and 0.5 μ m in enlargements.



Supplemental Figure S3 | Septin collar-to-ring transition depends on actin filament formation. **a**, Cells coexpressing Cdc10-RFP and Cdc15-GFP under control of their endogenous promoters were blocked with the Don3 kinase inhibitor NA-PP1 for 4 h and treated for 15 min with 10 μ M Latrunculin A (LatA) in the presence of NA-PP1. **b**, as described before, but NA-PP1 inhibition was released during treatment with Latrunculin A. Scale bars, 2.5 μ m (DIC) and 0.8 μ m (Fluorescent micrographs).

References

- ¹ Weirich, C. S., Erzberger, J. P. & Barral, Y., The septin family of GTPases: architecture and dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 478-489 (2008).
- ² Vrabioiu, A. M. & Mitchison, T. J., Structural insights into yeast septin organization from polarized fluorescence microscopy. *Nature* **443**, 466-469 (2006).
- ³ Banuett, F. & Herskowitz, I., Bud morphogenesis and the actin and microtubule cytoskeletons during budding in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **37**, 149-170 (2002).
- ⁴ Böhmer, C., Böhmer, M., Bölker, M. & Sandrock, B., Cdc42 and the Ste20-like kinase Don3 act independently in triggering cytokinesis in *Ustilago maydis*. *J Cell Sci* **121**, 143-148 (2008).
- ⁵ O'Donnell, K. L. & McLaughlin, D. J., Postmeiotic mitosis, basidiospore development, and septation in *Ustilago maydis*. *Mycologia* **76**, 486-502 (1984).
- ⁶ Weinzierl, G. et al., Regulation of cell separation in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **45**, 219-231. (2002).
- ⁷ Mahlert, M., Leveleki, L., Hlubek, A., Sandrock, B. & Bölker, M., Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **59**, 567-578 (2006).
- ⁸ Byers, B. & Goetsch, L., A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. *J Cell Biol* **69**, 717-721 (1976).
- ⁹ Versele, M. & Thorner, J., Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual. *Trends Cell Biol* **15**, 414-424 (2005).
- ¹⁰ Bertin, A. et al., *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 8274-8279 (2008).
- ¹¹ Frazier, J. A. et al., Polymerization of purified yeast septins: evidence that organized filament arrays may not be required for septin function. *J Cell Biol* **143**, 737-749 (1998).
- ¹² John, C. M. et al., The *Caenorhabditis elegans* septin complex is nonpolar. *Embo J* **26**, 3296-3307 (2007).
- ¹³ Vrabioiu, A. M. & Mitchison, T. J., Symmetry of septin hourglass and ring structures. *J Mol Biol* **372**, 37-49 (2007).
- ¹⁴ McMurray, M. A. & Thorner, J., Septin stability and recycling during dynamic structural transitions in cell division and development. *Curr Biol* **18**, 1203-1208 (2008).
- ¹⁵ Boyce, K. J., Chang, H., D'Souza, C. A. & Kronstad, J. W., An *Ustilago maydis* septin is required for filamentous growth in culture and for full symptom development on maize. *Eukaryot Cell* **4**, 2044-2056 (2005).
- ¹⁶ Pan, F., Malmberg, R. L. & Momany, M., Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evol Biol* **7**, 103 (2007).
- ¹⁷ McCollum, D., Balasubramanian, M. K., Pelcher, L. E., Hemmingsen, S. M. & Gould, K. L., *Schizosaccharomyces pombe cdc4+* gene encodes a novel EF-hand protein essential for cytokinesis. *J Cell Biol* **130**, 651-660 (1995).
- ¹⁸ Wu, J. Q., Kuhn, J. R., Kovar, D. R. & Pollard, T. D., Spatial and temporal pathway for assembly and constriction of the contractile ring in fission yeast cytokinesis. *Dev Cell* **5**, 723-734 (2003).
- ¹⁹ Kinoshita, M., Field, C. M., Coughlin, M. L., Straight, A. F. & Mitchison, T. J., Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins. *Dev Cell* **3**, 791-802 (2002).
- ²⁰ Schulz, B. et al., The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**, 295-306 (1990).
- ²¹ Loubradou, G., Brachmann, A., Feldbrugge, M. & Kahmann, R., A homologue of the transcriptional repressor Ssn6p antagonizes cAMP signalling in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **40**, 719-730. (2001).
- ²² Kämper, J., A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **271**, 103-110 (2004).
- ²³ Pringle, J. R., Preston, R. A., Adams, A. E. M., Stearns, T. & Drubin, D. G., Fluorescence microscopy methods for yeast. *Methods Cell Biol* **31**, 357-435 (1989).

2.3 Unveröffentlichte Daten (Manuskript in Bearbeitung)

In diesem Kapitel werden weitere Ergebnisse dargestellt, die die Grundlage für eine weitere, bereits in Bearbeitung befindliche Publikation bilden. Die Diskussion dieser Ergebnisse wird im Kapitel 3. *Diskussion* abgehandelt. Material und Methoden entsprechen denen aus Publikation 1 und 2.

In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* wird durch die septinspezifische Proteinkinase Gin4 und durch die regulatorische Untereinheit Rts1 der Proteinphosphatase 2A der Phosphorylierungszustand der Septine beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des Septins Shs1 direkt durch Gin4 erfolgt. Gemeinsam mit der durch Rts1 herbeigeführten Dephosphorylierung desselben Septins üben diese Proteine eine regulatorische Funktion auf die Septindynamik aus (Dobbelaere *et al.*, 2003). *gin4*-Deletionsmutanten der Bäckerhefe weisen starke Defekte in der Septinorganisation sowie assoziierte morphologische Veränderungen auf und sind nicht in der Lage, die Zelltrennung korrekt durchzuführen (Longtine *et al.*, 1998; Mortensen *et al.*, 2002; Versele *et al.*, 2004). *rts1*-Deletionsmutanten zeigen ebenfalls einen Zytokinese- und auch einen Zelltrennungsdefekt. Ursache hierfür scheint der verzögerte Abbau der gebildeten Septinringe in der späten Phase der Zytokinese zu sein (Dobbelaere *et al.*, 2003).

Die Funktion von Gin4 und Rts1 in *U. maydis* wurde durch die Herstellung von Deletionsmutanten und durch Überexpression der Proteine charakterisiert. Außerdem wurde die Lokalisierung von Gin4 und Rts1 während des Zellzyklus bestimmt. Durch die gleichzeitige Expression eines Cdc10-RFP Fusionsproteins war es möglich, die Kolo-kalisierung von Gin4 und Rts1 mit Septinstrukturen zu untersuchen. Gleichzeitig wurde der Einfluss einer Deletion bzw. Überexpression von Gin4 und Rts1 auf die Septindynamik untersucht.

Die Deletion der Proteinkinase Gin4 führt zu einem Zelltrennungsdefekt

Durch den Vergleich der Proteinsequenz von Gin4 aus *S. cerevisiae* mit der *U. maydis*-Datenbank konnte ein einziges, zu Gin4 homologes Protein gefunden werden (UM03928). Um die Funktion dieser Gin4 genannten Kinase in *U. maydis* zu

untersuchen, wurde zunächst eine Deletionsmutante generiert. Dies geschah sowohl in einem Wildtypstamm als auch in einem Stamm, der die analog-sensitive Version der Don3 Kinase (*don3-as*) unter der Kontrolle ihres natürlichen Promotors exprimiert.

gin4-Deletionsmutanten zeigen einen starken Zelltrennungsdefekt und bilden in Flüssigmedium bäumchenartige Strukturen aus (Abb. 8, DIC). Durch Färbung der Zellen mit Calcofluor, welches Chitineinlagerungen in den Zellwänden sichtbar macht, konnte in den *gin4*-Deletionsmutanten eine deutliche Misslokalisierung der Septen beobachtet werden (Abb. 8, Calcofluor). Die Zellen sind nicht mehr in der Lage, die Septenbildung gezielt an der Knospungszone durchzuführen, sondern bilden Septen an zufälligen Stellen innerhalb der Zelle. Direkt unterhalb der falsch platzierten Septen wurden lateral neue Knospen angelegt. Die Bildung einer klar definierten Fragmentierungszone, wie sie in wildtypischen Zellen stattfindet, konnte in *gin4*-Deletionsmutanten ebenfalls nicht beobachtet werden.

Es stellte sich die Frage, ob es sich bei den beobachteten misslokalisierten Septen um primäre oder sekundäre handelt. Dies wurde durch die Inhibierung der analog-sensitiven Version der Don3-Kinase untersucht, da dies in Wildtypzellen sehr spezifisch die Ausbildung von sekundären Septen verhindert. Unter nicht-inhibierenden Bedingungen zeigten die Zellen das charakteristische Wachstumsverhalten der *gin4*-Deletionsmutanten (Abb. 8, - NA-PP1). Inhibierung von Don3^{M157A} durch NA-PP1 führte zu einer deutlichen Vergrößerung der Zellcluster (Abb. 8, + NA-PP1). Dies deutet daraufhin, dass die *gin4*-Deletionsmutanten in Gegenwart einer aktiven Don3 Kinase sekundäre Septen bilden können, wodurch zumindest einige Zellen in der Lage sind, sich voneinander zu lösen. Weiterhin finden sich in *gin4*-Deletionsmutanten auch nach Inhibierung von Don3 noch misslokalisierte Septen. Bei diesen Septen kann es sich deshalb nur um primäre Septen handeln. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass *gin4*-Deletionsmutanten im Prinzip in der Lage sind, sowohl primäre als auch sekundäre Septen auszubilden, diese jedoch aufgrund ihrer Misslokalisierung nicht ihre eigentliche Funktion bei der Zelltrennung ausüben können. Deshalb stellte sich die Frage inwieweit die Misslokalisierung der Septen im Zusammenhang mit Defekten in der Septindynamik stand.

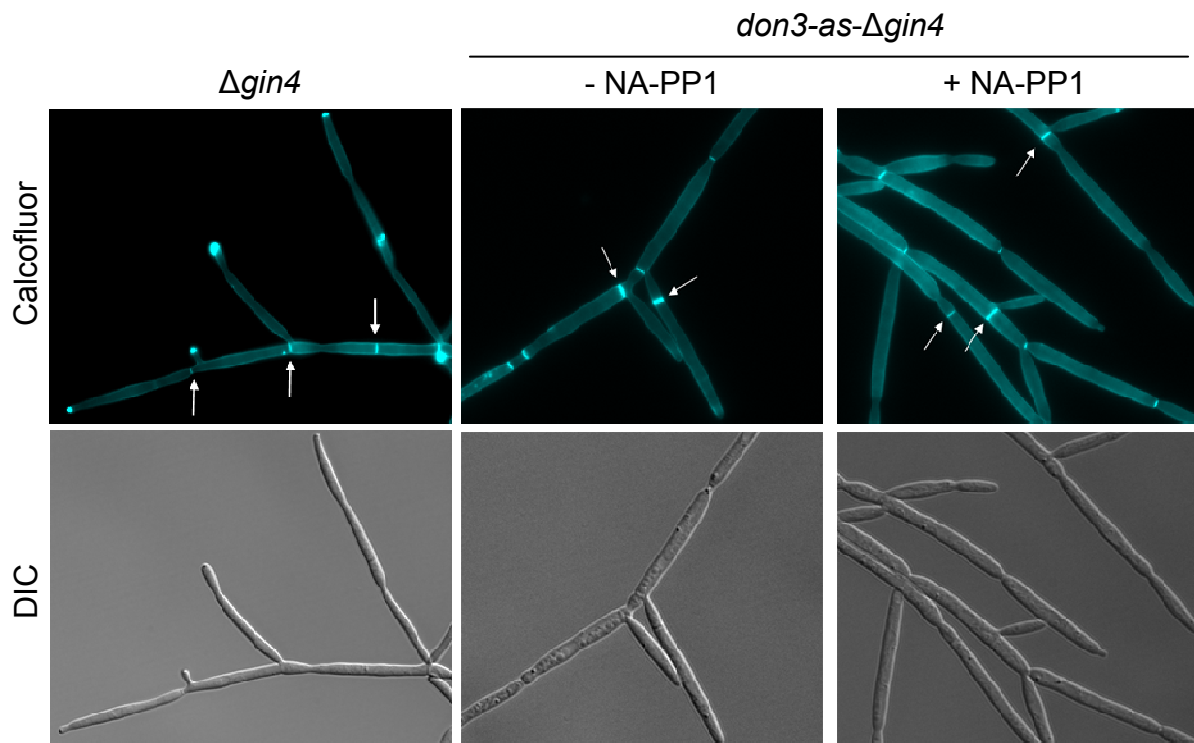


Abb. 8: Die Deletion von *gin4* führt zu einem Zelltrennungsdefekt. Zellen, denen das *gin4*-Gen fehlt (links), zeigen einen Zelltrennungsdefekt und sind nicht in der Lage, Septen korrekt zu positionieren. Vielmehr werden Zellwände willkürlich innerhalb des Zytoplasmas gebildet (Pfeile), unterhalb derer oft die Ausbildung neuer Knospen stattfindet. Die Inhibierung der analog-sensitiven Version der Kinase Don3^{M157A} in einer *gin4*-Deletionsmutante (rechts) führt zu einer Verstärkung des Zelltrennungsdefekts, was in der Ausbildung von größeren Zellclustern resultiert. Dies lässt darauf schließen, dass in *gin4*-Deletionsmutanten auch sekundäre Septen gebildet werden, die zumindest teilweise zu einer Zelltrennung beitragen. Die falsch positionierten Septen in Don3-inhibierten Zellen weisen auf die Bildung von primären Septen in *gin4*-Deletionsmutanten hin. Nicht-inhibierte Zellen (Mitte) zeigen einen Phänotyp, der dem der *gin4*-Mutante entspricht. Septen wurden mit Calcofluor angefärbt.

Die Deletion der Proteinkinase Gin4 führt zu einer gestörten Septindynamik

Um in den *gin4*-Deletionsmutanten die Septindynamik eingehender zu untersuchen, wurde in diesen Zellen das Septin Cdc10 als RFP-Fusionsprotein unter Kontrolle des konstitutiv aktiven *etef*-Promotors exprimiert. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde die Lokalisierung der Septine bzw. der Septinstrukturen beobachtet. Dabei zeigte sich, dass die Zellen während der Knospung einen Septincollar ausbilden (Abb. 9, Pfeile). Dieser Septincollar wurde jedoch auch in Zellen beobachtet, die selber bereits neue Knospen gebildet hatten. Somit blieben der Abbau und die Umwandlung dieser Septinstruktur in einen Septinring aus und es fand im Bereich dieser Septinstrukturen auch keine Synthese eines Septums statt (Abb. 9, Calcofluor).

Daneben konnten misslokalisierte Septinstrukturen innerhalb der Zellen beobachtet werden (Abb. 9, Pfeilspitzen). Dabei handelte es sich hauptsächlich um Septinringe, die mit neusynthetisierten Septen (Abb. 9, Sternchen) kolokalisierten und verschwanden, nachdem diese fertiggestellt waren. Eine Akkumulation von endosomalen Vesikeln, wie dies in wildtypischen Zellen innerhalb der septinfreien Fragmentierungszone stattfindet (Schink *et al.*, 2008), konnte lediglich vereinzelt beobachtet werden (nicht gezeigt). Die Deletion der Kinase Gin4 führt somit zu einer starken Beeinflussung der Septindynamik. Um weitere Aufschlüsse über die Funktion der Kinase zu erhalten, wurde die Lokalisierung von Gin4 während der Zytokinese untersucht.

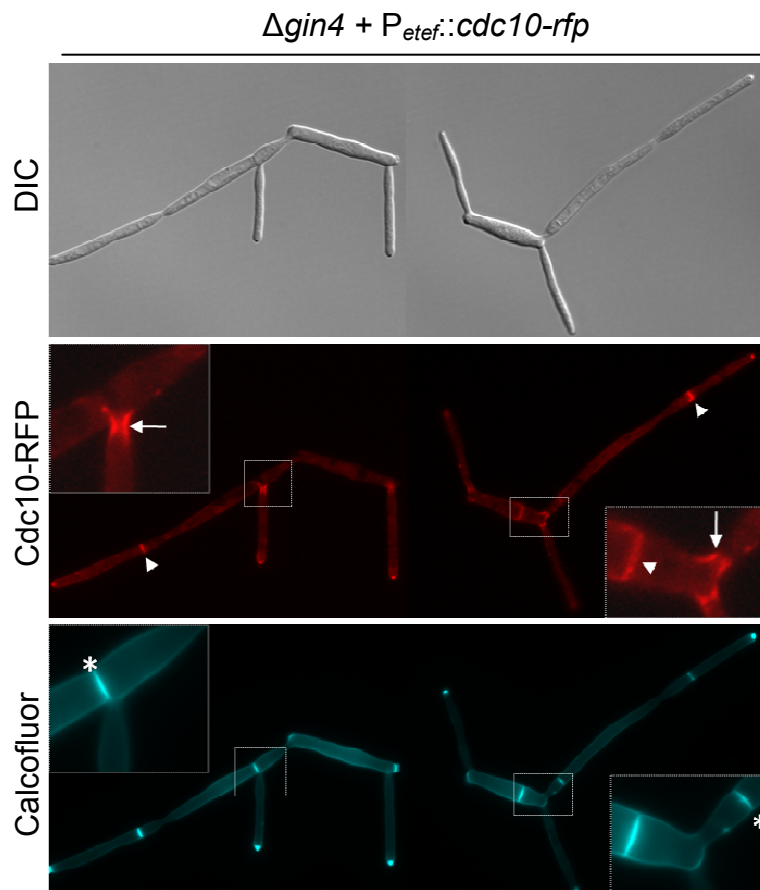


Abb. 9: Septinlokalisierung in einer *gin4*-Deletionsmutante. Gezeigt ist eine *gin4*-Deletionsmutante, die das Septin Cdc10 als RFP-Fusionsprotein unter Kontrolle des *etef*-Promotors konstitutiv exprimiert. Die Zellen waren in der Lage, einen Septincollar während der Knospung neuer Zellen auszubilden (Pfeile). Dieser Septincollar konnte jedoch auch in älteren Zellen innerhalb des Zellclusters beobachtet werden (rechts). Somit blieben der Abbau und die Umwandlung dieser Septinstruktur in einen Septinring aus. Die Synthese eines Septums im Bereich dieser Septinstrukturen konnte zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden (Calcofluor). Daneben wurden misslokalisierte Septinstrukturen (Pfeilspitzen) innerhalb der Zellen ausgebildet, bei denen es sich hauptsächlich um Septinringe handelte. Diese kolokalisierten mit Septen (Sternchen) während deren Synthese und verschwanden nach deren Vollendung.

Die Proteinkinase Gin4 lokalisiert in der Teilungsebene in Form eines Collars

Um die Lokalisierung der Kinase Gin4 zu bestimmen, wurde in einer *gin4*-Deletionsmutante ein Gin4-GFP Fusionsprotein unter dem konstitutiv aktiven *etef*-Promotor exprimiert. Die Expression des Fusionsproteins führte zu einer Komplementation der *gin4*-Deletionsmutante. Dies äußerte sich durch ein wildtypisches Septierungs- und Trennungsverhalten der Zellen (Abb. 10). Dabei schien auch die Überexpression der Kinase Gin4 keinen weiteren Einfluss auf die Zellen zu haben.

Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen konnte in Zellen mit kleinen Knospen eine deutliche Lokalisierung des Fusionsproteins in der Teilungsebene beobachtet werden. Ähnlich wie die Septine (siehe Publikation 2) lokalisierte Gin4 in Form eines Collars (Abb. 10, Pfeilköpfe). Die Anfärbung der Zellen mit Calcofluor zeigte, dass die Gin4 Lokalisierung nur in einem bestimmten Zeitraum während der Zellteilung stattfindet. Dieser beginnt kurz nach dem Erscheinen der neuen Knospe und endet direkt vor der Synthese des primären Septums. Interessanterweise konnte jedoch keine Lokalisierung von Gin4 am Septum beobachtet werden. In allen weiteren Phasen des Zellzyklus befand sich Gin4-GFP im Zytoplasma der Zellen (Abb. 10).

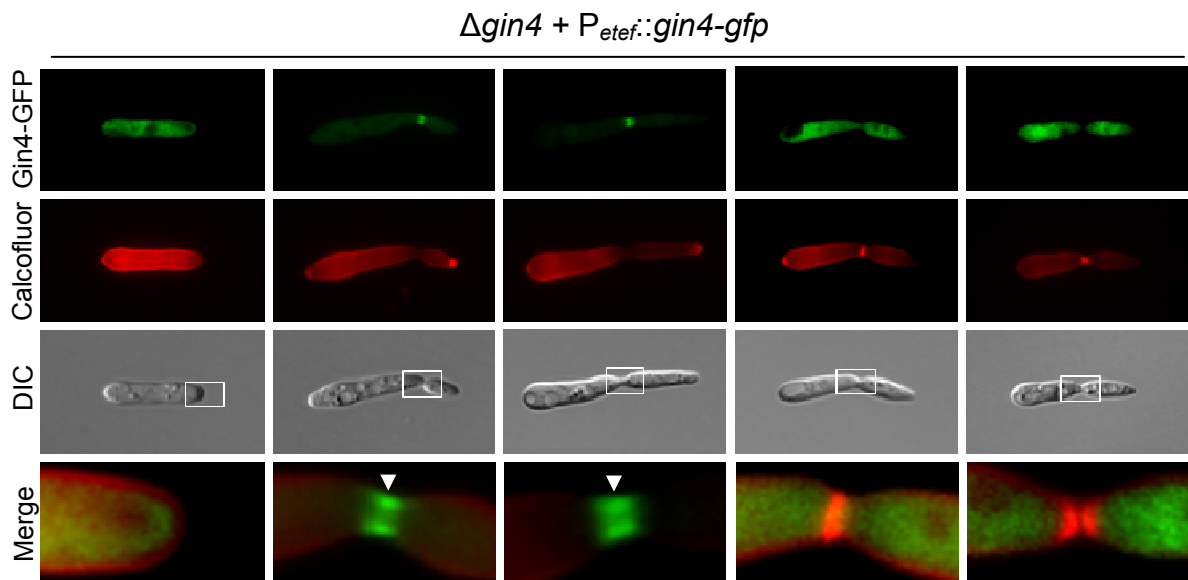


Abb. 10: Gin4 lokalisiert in der Teilungsebene in Form eines Collars. Gezeigt ist eine *gin4*-Deletionsmutante komplementiert durch *gin4-gfp* unter Kontrolle des konstitutiv aktiven *etef*-Promotors. Gin4 lokalisiert transient in der Teilungsebene in Form eines Collars (Pfeilspitzen). Eine Färbung der Zellen mit Calcofluor zeigt, dass diese Form der Lokalisierung auf die Phase vom Beginn der Knospenbildung bis kurz vor der Synthese des primären Septums beschränkt ist. In allen anderen Phasen des Zellzyklus befindet sich das Fusionsprotein im Zytoplasma der Zellen.

Gin4 und der primäre Septincollar zeigen eine transiente Kolokalisierung

Als nächstes stellte sich die Frage, ob die Proteinkinase Gin4 mit den Septinproteinen kolokalisiert. Dazu wurde eine zusätzliche Kopie des Gin4-GFP Fusionsproteins in einen Stamm eingebracht (siehe oben), der das Septin Cdc10-RFP am natürlichen Ort des Septins exprimiert. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass Gin4 mit dem bei der Knospung angelegten Septincollar kolokalisiert, diesen jedoch zunächst nicht vollständig sondern eher zentral abdeckt (Abb. 11, links). Interessanterweise verschwand der Septincollar vollständig, nachdem der Gin4-Collar eine breitere Struktur angenommen hatte (Abb. 11, Mitte). Daran anschließend markiert der Gin4-Collar einen septinfreien Raum, der vermutlich mit der zukünftigen Fragmentierungszone korrespondiert (Abb. 11, Sternchen). Der Aufbau eines neuen Septincollars findet in der Mutterzelle unmittelbar neben dem Gin4-Collar statt (Abb. 11, Pfeile). Anschließend löste sich noch der Gin4-Collar auf, bevor der neu entstandene Septincollar die Umwandlung in einen Ring begonnen hatte.

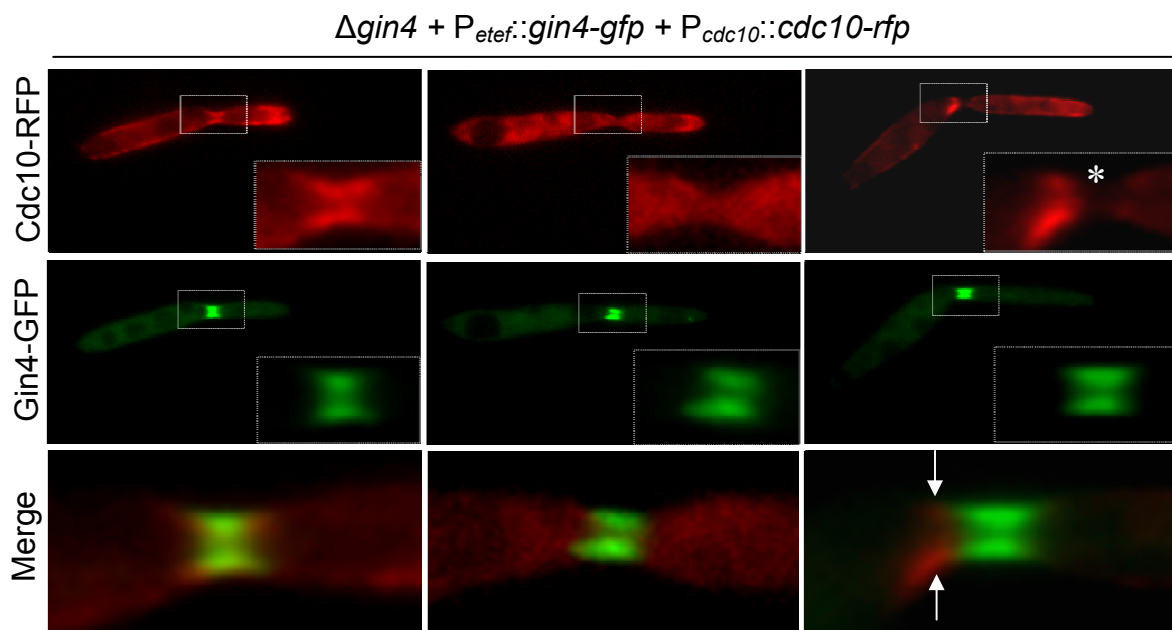


Abb. 11: Gin4 und der primäre Septincollar zeigen eine transiente Kolokalisierung. Gezeigt ist eine *gin4*-Deletionsmutante komplementiert durch *gin4-gfp* unter Kontrolle des konstitutiv induzierten *etef*-Promotors. Zusätzlich exprimiert dieser Stamm ein Cdc10-RFP Fusionsprotein. Gin4 zeigt eine teilweise, zentrale Kolokalisierung mit dem bei der Knospung angelegten Septincollar (links). Nachdem Gin4 eine breitere Form ausfüllt verschwindet der primäre Septincollar (Mitte). Daran anschließend markiert Gin4 einen septinfreien Bereich (rechts, Sternchen). Unmittelbar daneben, innerhalb der Mutterzelle, kann der Aufbau eines neuen Septincollars beobachtet werden (rechts, Pfeile).

Diese Beobachtungen und der Phänotyp der *gin4*-Deletionsmutante lassen vermuten, dass die Proteinkinase Gin4 sowohl beim Abbau des Septincollars als auch bei der Ausbildung der septinfreien Fragmentierungszone und damit auch für die Positionierung der Septen eine wichtige Funktion ausübt.

Die Deletion von Rts1, der regulatorischen B' Untereinheit der Proteinphosphatase 2A, führt zu einem Zelltrennungsdefekt

Zur Identifizierung eines Homologs der regulatorischen Untereinheit der Proteinphosphatase 2A wurde die Proteinsequenz von Rts1 aus *S. cerevisiae* mit der Genomsequenz von *U. maydis* verglichen. Dabei konnte ein homologes Protein in *U. maydis* identifiziert werden (UM02873). Dieses zeigte einen hochkonservierten Bereich mit einer Sequenzidentität von 60 %.

Um Hinweise auf die Funktion von Rts1 bei der Zelltrennung und für die Septindynamik in *U. maydis* zu erhalten, wurde das *rts1*-Gen in einem Stamm deletiert, der gleichzeitig das fluoreszierende Septin Cdc10-RFP unter der Kontrolle seines natürlichen Promotors exprimiert. Die *rts1*-Deletionsmutanten zeigten einen deutlichen Zelltrennungsdefekt und bildeten in Flüssigmedium bäumchenartige Strukturen aus. Durch Anfärben der Septen mit Calcofluor konnte beobachtet werden, dass die Septen an der richtigen Stelle positioniert wurden und dass sowohl primäre als auch sekundäre Septen gebildet wurden. Trotz der Ausbildung dieser Septen (Abb. 12, Calcofluor) konnten die Zellen sich jedoch nicht voneinander trennen. Durch die Analyse des Septinmarkers Cdc10-RFP konnte beobachtet werden, dass die Auflösung des sekundären Septinrings gar nicht oder nur stark verzögert stattfand. Dies führt dazu, dass selbst in Zellen, die bereits neue Knospen gebildet haben, immer noch der sekundäre Septinring vorhanden war (Abb. 12, links).

Für die Umwandlung des sekundären Septincollars in einen Ring wird die Aktivität der Proteinkinase Don3 benötigt (siehe Publikation 2). Um zu überprüfen, ob es auch in einem *rts1*-Hintergrund möglich ist, die Ausbildung der stabilen Septinringe durch die Inhibierung der Don3 Aktivität zu verhindern, wurde die analog-sensitive Version der Don3 Kinase am Ort des *don3*-Gens in den oben verwendeten Stamm eingeführt. Ohne Inhibierung der Don3 Kinase zeigten die Zellen den bereits

beschriebenen Phänotyp einer *rts1*-Deletionsmutante (Abb. 12, Mitte). Inhibierte Zellen zeigten eine natürliche Septindynamik, waren aber nicht in der Lage den sekundären Septincollar in einen Ring zu überführen. Daher konnten keine stabilen, sekundären Septinringe beobachtet werden (Abb. 12, rechts). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die Aktivität von Rts1 ausschließlich nach der von Don3 wirkt und für den Abbau des sekundären Septinrings benötigt wird.

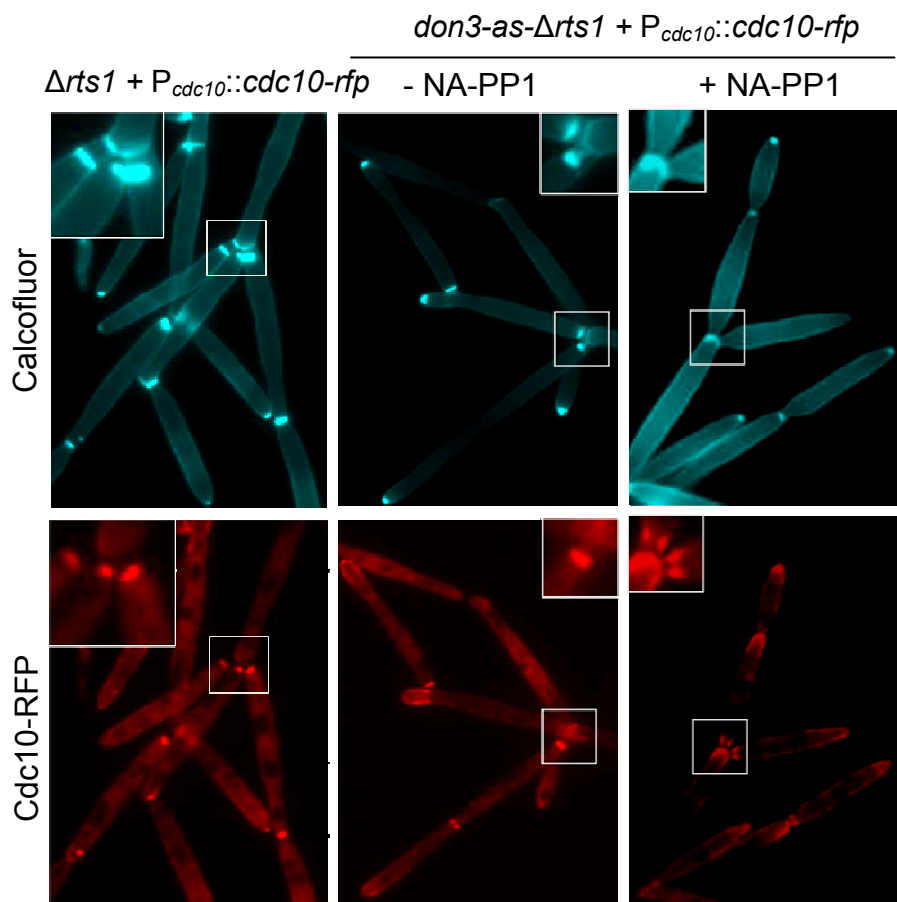


Abb. 12: *rts1*-Deletionsmutanten haben einen Zelltrennungsdefekt. Eine *rts1*-Deletionsmutante, die zusätzlich ein Cdc10-RFP Fusionsprotein am natürlichen Ort des Septins exprimiert, wurde mit Calcofluor angefärbt (links). Obwohl die Mutante in der Lage ist, beide Septen korrekt auszubilden, zeigen die Zellen einen Trennungsdefekt. Dieser scheint im fehlenden Abbau des sekundären Septinrings begründet zu sein, da dieser auch in Zellen, die selber bereits neue Töchter ausgebildet haben, stabil vorliegt. Ein Stamm, der zusätzlich die analog-sensitive Version der Don3 Kinase am natürlichen Ort der Kinase exprimiert, wurde mit dem Inhibitor NA-PP1 inhibiert (rechts). Don3-inhibierte Zellen zeigten keine stabilen Septinringe sondern stabile Septincollar. Dies zeigt dass die Aktivität von Rts1 nach der von Don3 benötigt wird. Nicht-inhibierte Zellen dienten als Kontrolle (Mitte).

Rts1-Überexpression hat eine gestörte Zellmorphologie zur Folge

Zur weiteren Charakterisierung von Rts1 wurde die Lokalisierung des Proteins bestimmt. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass eine Überexpression des Rts1 Proteins negative Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit der Zelle hat, wurde zunächst eine C-terminale GFP-Fusion am Ort des *rts1*-Gens erzeugt. Diese Zellen zeigten keine morphologischen Veränderungen und normales Wachstumsverhalten. Die schwache Expression von Rts1 verhinderte jedoch eine eindeutige Lokalisierung des Rts1-GFP Fusionsproteins. Daher wurde eine Überexpression des Rts1-GFP Fusionsproteins mit Hilfe des regulierbaren *crg*-Promotors durchgeführt. Gleichzeitig wurde in diesen Zellen wiederum der Septinmarker Cdc10-RFP unter Kontrolle seines natürlichen Promotors exprimiert.

Die unter reprimierenden Bedingungen angezogenen Kulturen dienten als Kontrolle und zeigten normales Wachstum (Daten nicht gezeigt). Unter induzierenden Bedingungen wiesen die Zellen eine zitronenförmige Zellmorphologie auf und teilten sich durch ein einzelnes, zentrales Septum (Abb. 13, Calcofluor). Dieser Phänotyp ähnelt dem einer Deletionsmutante des Septins Cdc11 (siehe 1.3.1) (Boyce *et al.*, 2005). Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Septinmarkers Cdc10-RFP zeigte außerdem die Ausbildung einer zentralen Septinstruktur. Diese markierte die Position des Septums, das mit dieser Struktur kolokalisiert (Abb. 13, rechts). In diesen Zellen wurde die Lokalisierung des Rts1-GFP Fusionsproteins bestimmt. Dieses kolokalisierte immer an der Septinstruktur, sobald diese zu beobachten war (Abb. 13, Mitte + rechts). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Rts1 bei starker Expression mindestens eines der vier Septine aus *U. maydis* durch kontinuierliche Dephosphorylierung in seiner Funktion stört und somit eine Deletion desselben simuliert.

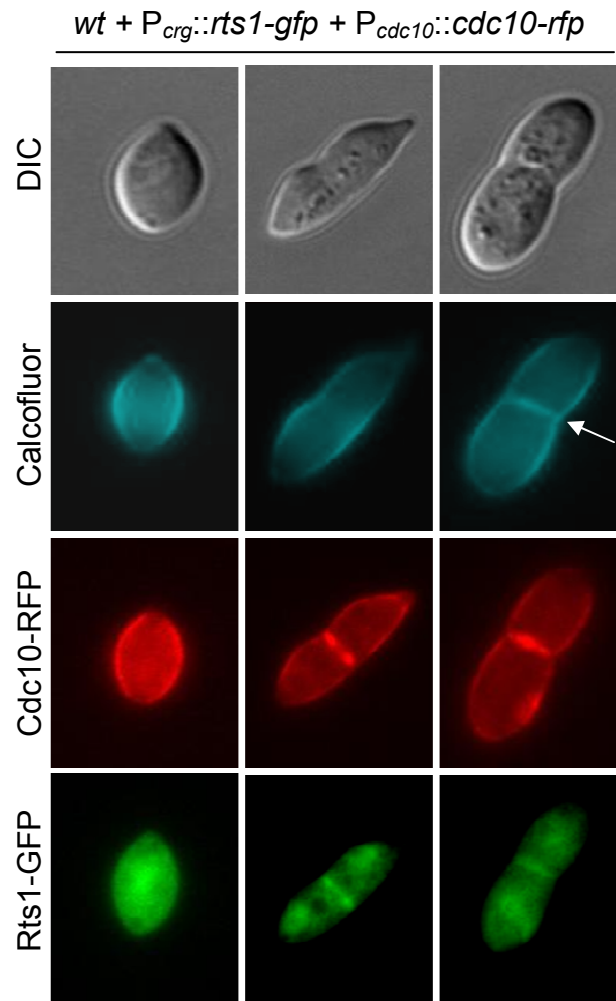


Abb. 13: Rts1-Überexpression beeinflusst Zellmorphologie und Zelltrennung. Gezeigt sind mit Calcofluor gefärbte Zellen, in denen mittels *crg*-Promotor eine Überexpression des Rts1-GFP Fusionsproteins am natürlichen Ort des Proteins induziert wurde. Zusätzlich exprimieren diese Zellen das Fusionsprotein Cdc10-RFP am natürlichen Ort des Septins. Die zitronenförmige Morphologie und die durch ein zentrales Septum (Pfeil) durchgeführte Trennung der Zellen erinnern an den Phänotyp von Septinmutanten. Rts1 lokalisiert an einer zentralen Septinstruktur, die bereits vor der Synthese des Septums angelegt wird (Mitte). Beide Proteine kolokalisieren auch noch mit dem Septum (rechts).

3 Diskussion

Das zeitliche und räumliche Zusammenwirken von Septin- und Aktomyosinstrukturen spielt in allen eukaryotischen Zellen eine entscheidende Rolle für die korrekte Durchführung der Zytokinese. Der neue Modellorganismus *Ustilago maydis* eignet sich besonders gut für die Untersuchung dieser Strukturen, da sich dieser Pilz hinsichtlich Zytokinese und Zelltrennung erheblich von anderen etablierten Modellorganismen wie der Bäcker- oder der Spalthefe unterscheidet. Ein Vergleich dieser Modellorganismen mit *U. maydis* bezüglich der Septin- und Aktomyosindynamik sollte deshalb zu einem tieferen Verständnis über den Ablauf und die Funktion der Zytokinese führen.

In dieser Arbeit wurde die Septin- und Aktomyosindynamik während der Zellteilung haploider Sporidien von *U. maydis* untersucht. Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass es während der Zytokinese zu einem sukzessiven Aufbau zweier Aktomyosinringe kommt. Der Aufbau des sekundären Aktomyosinrings erfordert die Aktivität der kleinen GTPase Cdc42 und die der *germinal centre* Kinase Don3. Beide Proteine fungieren dabei unabhängig von einander in zwei getrennten Signalkaskaden. Beiden Aktomyosinringen ging jeweils der Aufbau eines Septincollars voraus. Dieser markiert die Septierungsstelle und dient zugleich als Gerüst für den Aufbau des kontraktiven Rings. Ist dieser Aufbau vollendet, findet die Umwandlung des Septincollars in eine Ringstruktur statt. Durch chemisch-genetische Analyse der Don3 Kinase konnte gezeigt werden, dass die Umwandlung des Septincollars in einen Ring nicht durch eine mechanische Rotation der Septinfilamente, sondern vielmehr durch die Auflösung des Septincollars und einem anschließenden Wiederaufbau des Septinrings erfolgt. Dabei ist der beobachtete Wiederaufbau abhängig von einem intakten Aktomyosinring, der vermutlich als Gerüst für den Aufbau des Septinrings dient. Zuletzt konnten für die septinspezifische Proteinkinase Gin4 und für die regulatorische Untereinheit der Proteinphosphatase 2A, Rts1, entscheidende Funktionen für den Ablauf der beobachteten Septindynamik gezeigt werden.

3.1 Während der Zellteilung von *U. maydis* kommt es zur aufeinanderfolgenden Umwandlung zweier Septincollars in Septinringe

Die Fluoreszenzmikroskopie erlaubt es, die Dynamik von fluoreszenzmarkierten Proteinen innerhalb lebender Mikroorganismen zu studieren. In dieser Arbeit wurde als Marker für die Darstellung der Septindynamik das Septin Cdc10 verwendet. Es konnte aber beobachtet werden, dass das Septin Cdc12 aus *U. maydis* eine dem Cdc10 vergleichbare Dynamik zeigt (Daten nicht gezeigt). Da die vegetativ exprimierten Septine sowohl in der Bäckerhefe als auch in der Spalthefe immer als Heterooligomere vorliegen sind die mit Cdc10 erzielten Ergebnisse vermutlich auch auf die anderen drei in *U. maydis* vorkommenden Septine übertragbar (Haarer *et al.*, 1987; An *et al.*, 2004). Dies müsste jedoch noch experimentell überprüft werden.

Vergleichbar mit der Bäckerhefe und *C. albicans* bildet sich auch in *U. maydis* innerhalb der Knospungsebene zunächst eine Sanduhr-ähnliche Septinstruktur (Septincollar) (Byers *et al.*, 1976; Frazier *et al.*, 1998; Gale *et al.*, 2001). Diese Struktur sorgt in Zellen, die sich durch Knospung vermehren, für die mechanische Stabilität der Knospungsstelle, um dem in der Zelle vorhandenen Druck entgegenzuwirken. Während in der Bäckerhefe bereits vor dem Beginn der Knospung ein Septinring die zukünftige Knospungsstelle markiert, entwickelt sich der Septincollar in *U. maydis* mit dem Beginn des Knospungsvorgangs, ohne dass vorher eine Ringstruktur sichtbar wäre. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die zigarrenförmige Form von *U. maydis* sein, die eine Ringstruktur in der verjüngten Zellspitze nur sehr schwer erkennen lässt. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch in *U. maydis* der Septincollarbildung die Assemblierung eines Septinrings vorausgeht. Nach dem Abschluss der Knospenbildung erfolgt eine Umwandlung dieses Septincollars in eine Ringstruktur. Dies geht einher mit der Assemblierung des primären Aktomyosinrings. Dabei befindet sich der Septinring direkt am Aktomyosinring auf der Seite der Mutterzelle. Eine Teilung des Septincollars bei der Umwandlung in die Ringstruktur, wie dies für die Bäckerhefe beschrieben wurde (Kim *et al.*, 1991; Lippincott *et al.*, 2001), konnte in *U. maydis* nicht beobachtet werden. Stattdessen erfolgte nach der Synthese des primären Septums die Ausbildung eines sekundären Septincollars innerhalb der Tochterzelle. Diese Struktur dient wiederum als Gerüst für den Aufbau eines Aktomyosinrings. Auch der sekundäre Septincollar wandelt sich in eine Ringstruktur um. Dies weist darauf hin,

dass die Ausbildung beider Septen nach einem sehr ähnlichen Mechanismus abzulaufen scheint.

3.2 Während der Umwandlung des Septincollars kommt es zu einer transienten Auflösung der Septinstruktur

Die Dynamik der Septinkomplexe wurde intensiv in der Bäckerhefe untersucht. Es wurde gezeigt, dass die aus den Septinfilamenten gebildeten Strukturen während des Zellzyklus größtenteils starr vorliegen, jedoch in zwei Phasen der Umstrukturierung kurzzeitig eine hohe Dynamik zeigen (Dobbelaere *et al.*, 2003). Dabei handelt es sich um die Überführung des ursprünglichen Septinrings in den Collar nach Beginn der Knospung und um die Umwandlung und Aufspaltung dieses Collars in die getrennten Septinringe während der Zytokinese. Es konnte gezeigt werden, dass es bei der letztgenannten Umwandlung zu einer Umorientierung der Septinfilamente von einer longitudinalen zu einer umlaufenden Ausrichtung kommt (Vrabioiu *et al.*, 2007). Der zu Grunde liegende Mechanismus, der diese dramatische Veränderung bewirkt, ist bisher nicht bekannt. Da während dieser Phase offensichtlich kein Abbau von Septinstrukturen stattfindet, wurde postuliert, dass es sich bei der Collar-zu-Ring Transition um eine 90°-Rotation innerhalb der Membranebene handelt. Außerdem wurde vermutet, dass diese Drehung der Septinfilamente eine mechanische Funktion während der Zytokinese ausüben könnte (Vrabioiu *et al.*, 2007).

Durch die Beobachtung, dass es in *U. maydis* während der Zytokinese zu einem Abbau und Wiederaufbau der Septinstrukturen kommt, kann zumindest für *U. maydis* eine mechanische Funktion der Transition ausgeschlossen werden. Dabei bleibt die Frage offen, auf welcher Ebene dieser Abbau stattfindet. So wäre es durchaus möglich, dass lediglich Septinfilamente ihre gegenseitige Bindung verlieren und diese sich durch Neuordnung in eine Ringstruktur begeben. Andererseits könnte es auch sein, dass die Septinfilamente selbst in Oligomere oder in Monomere zerfallen, die sich erst innerhalb der Ringstruktur zu neuen Filamenten zusammensetzen.

Eine weitere interessante Frage ist, ob die neugebildeten Septinringe ausschließlich aus den Proteinmolekülen des zuvor abgebauten Septincollars oder aber aus neu-synthetisierten, zytoplasmatischen Septinen besteht. Diese Frage könnte durch eine

sequentielle Expression unterschiedlich fluoreszierender Septinproteine und dem Einsatz der analog-sensitiven Kinase untersucht werden.

Der Nachweis, dass in *U. maydis* die Transition von Septinstrukturen während der Septierung nicht auf einer Rotation der Septinfilamente beruht, sondern durch Auflösung und Reassemblierung der Septinfilamente stattfindet, war möglich, da die Umwandlung des sekundären Septincollars von der Proteinkinase Don3 reguliert wird. Dadurch konnten, durch Inhibierung einer analog-sensitiven Variante dieser Kinase Zellen mit stabilen sekundären Septincollar erzeugt werden. Durch Entfernung des Inhibitors konnte weiterhin die Septinumwandlung synchronisiert werden. Erst dadurch war es möglich, diesen sehr schnellen Prozess (Lippincott *et al.*, 2001) gezielt untersuchen zu können.

Auch in logarithmisch wachsenden Wildtypzellen von *U. maydis* war es nur eine sehr kurze Phase, in der nur der durch Cdc15 markierte Aktomyosinring ohne jegliche Septinstruktur zu sehen war. Da diese kurze Phase jedoch nur in ca. jeder achthundertsten Zelle zu beobachten war (nicht gezeigt), muss bei einer geschätzten Dauer des Zellzyklus von etwa zwei Stunden davon ausgegangen werden, dass die Umwandlung der Septinfilamente innerhalb weniger als einer halben Minute erfolgt.

Daher ist es möglich, dass es sich bei der Collar-zu-Ring Transition in *S. cerevisiae* ebenfalls um einen Abbau und Aufbau von Septinstrukturen bzw. Septinfilamenten handelt, diese kurze Phase zwischen Abbau und Aufbau der Septinstrukturen jedoch bisher schwer zu beobachten war.

Offen bleibt, ob es auch in *U. maydis* zu einem Orientierungswechsel der Septinfilamente kommt. Da die umlaufend ausgerichteten Aktinfilamente des kontraktilen Rings (Kamasaki *et al.*, 2007) für die Bildung des Septinrings notwendig sind und bei der Zytokinese vermutlich während der Reassemblierung der Septinfilamente als Matrize dienen, ist anzunehmen, dass auch die Filamente des Septinrings umlaufend ausgerichtet sind und es somit auch in *U. maydis*, zu einem Orientierungswechsel der Filamente von exakt 90° kommt.

Durch Zugabe des Aktin-depolymerisierenden Reagenz Latrunculin A kann die Reassemblierung des sekundären Septinrings verhindert werden. Bestehende Septincollar wurden durch die Latrunculin A Behandlung jedoch nicht beeinflusst. Dies deutet daraufhin, dass die Aktomyosinstrukturen notwendig für Ausbildung des Septinrings sind. Interessanterweise wurden in der *cdc15*-Deletionsmutante transiente Septincollar beobachtet, die sich nach der Ausbildung eines stabilen *cdc4*-

Rings wieder auflösen. Zu einer Reassemblierung eines Septinrings kommt es in diesen Mutanten jedoch nicht. Zusammen zeigen diese Ergebnisse, dass Septincollar und Septinring zwei unabhängige Strukturen sind und dass nur die Bildung des Septinrings von einem funktionalen Aktomyosinring abhängt.

Eine ähnliche Abhängigkeit wurde auch für den Aufbau des Septinrings in der Spalthefe *S. pombe* beobachtet. Hier ist das Anillin-ähnliche Proteine Mid2, eine weitere Komponente des kontraktilen Rings, essentiell für den korrekten Aufbau der Septinfilamente (Tasto *et al.*, 2003). Auch für Säugetierzellen konnte gezeigt werden, dass Septinfilamente über das Adaptorprotein Anillin an den kontraktilen Ring rekrutiert werden, und dieser somit als Matrize dient (Kinoshita *et al.*, 2002). Interessanterweise wird auch für Hof1, das Cdc15 Homolog der Bäckerhefe, eine Funktion als Adaptorprotein zwischen Aktinfilamenten und Septinen postuliert (Norden *et al.*, 2004). Andererseits hat die Deletion von Hof1 keine Auswirkung auf die Septindynamik (Vallen *et al.*, 2000). In einem Hefe-2-Hybrid-Assay zeigte Cdc15 aus *U. maydis* keine direkte Interaktion mit einem der vier Septine (nicht gezeigt). Worauf die beobachtete Abhängigkeit des Septinrings von der Existenz eines funktionalen Aktomyosinrings in *U. maydis* beruht, bleibt somit offen.

Die Ausbildung eines Septincollars vor und während der Zytokinese konnte bisher nur in knospenden Pilzen beobachtet werden. In nicht-knospenden Pilzen wie z.B. der Spalthefe *S. pombe*, aber auch in menschlichen Zellen wird die Lokalisierung des Aktomyosinrings durch das Protein Anillin bzw. durch Anillin-ähnliche Proteine übernommen. Die mechanische Funktion eines Septincollars wird in diesen Zellen zu Beginn der Zytokinese anscheinend nicht benötigt. Allerdings findet auch in diesen Zellen nach dem Aufbau des Aktomyosinrings die Assemblierung eines Septinrings statt. In *S. pombe* ist dieser essentiell für die Zytokinese und fungiert während der Umstrukturierung der Plasmamembran vermutlich als Diffusionsbarriere ähnlich wie es für Septine in knospenden Pilzen gezeitigt werden konnte (Martin-Cuadrado *et al.*, 2005).

Daher kann davon ausgegangen werden, dass Septinfilamente in knospenden Pilzen eine duale Funktion übernehmen. Die longitudinal ausgerichteten Filamente des Collars gewähren mechanische Stabilität der Knospungsstelle und wirken als *Scaffold* für Aktomyosinringkomponenten, während die umlaufend ausgerichteten Filamente bei der Zytokinese als eine Diffusionsbarriere fungieren und für die Lokalisierung von Proteinen notwendig sind, die an der Invagination und Fusion der

Plasmamembran beteiligt sind. Da diese Strukturen offensichtlich unabhängig voneinander existieren und agieren, benötigt die Transition zwischen diesen Strukturen auch nicht notwendigerweise eine mechanische Rotation der Septinfilamente.

Es stellt sich die Frage, auf welche Weise die Dynamik der Septinstrukturen reguliert wird und welche Funktion die Don3 Kinase dabei ausübt. In *S. cerevisiae* kommt es während der Zytokinese zu einer posttranslationalen Modifikation der Septinproteine durch Phosphorylierung. Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des Septins Cdc3 durch die Cyclin-abhängige Kinase Cdc28 am Abbau der Septinringe beteiligt ist (Tang *et al.*, 2002). Außerdem sind Septine Substrate der p21-aktivierten Kinase Cla4, die wie Don3 zu den Ste20-ähnlichen Kinasen gehört. Somit ist es vorstellbar, dass in *U. maydis* die Phosphorylierung eines oder mehrerer Septine durch Don3 zu dem beobachteten Abbau des Septincollars führt. Dies könnte es wiederum Cdc42 ermöglichen, den Aktomyosinring aufzubauen. Gegen diese Vermutung spricht jedoch die Beobachtung, dass auch in $\Delta cdc42$ -Mutanten ein stabiler sekundärer Septincollar vorliegt. Außerdem gelang es nicht, für Don3 in einem Hefe-2-Hybrid-Assay eine Interaktion mit einem der vier Septine nachzuweisen (nicht gezeigt). Daher lässt sich eher vermuten, dass sowohl Don3 als auch Cdc42 für den Aufbau des Aktomyosinrings benötigt werden (siehe 3.4) und dass der Abbau des Septincollars nur eine indirekte Folge darstellt.

3.3 Don3 und Cdc42 wirken unabhängig voneinander in zwei getrennten Signalkaskaden

Die chemische Genetik erlaubt die spezifische und zeitnahe Analyse von Kinasen ohne dabei deren zelluläre Lokalisierung oder deren Wirkung in einem Komplex negativ zu beeinflussen (siehe 1.4). In dieser Arbeit konnte eine analog-sensitive Version der Don3 durch einen einzelnen Aminosäureaustausch (M157A) in der ATP-Bindetasche erzeugt werden. Der Aminosäureaustausch M157G führte dagegen zu einem Funktionsverlust der Don3 Kinase. Eine ähnliche Inaktivierung ist bereits für andere Kinasen beschrieben worden. Ursache hierfür ist vermutlich eine Fehlfaltung der ATP-Bindetasche des modifizierten Proteins aufgrund der großen Beweglichkeit der kleinen Aminosäure Glycin. Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch

Einführung zusätzlicher Mutationen diese Fehlfaltung verhindert werden kann (Zhang *et al.*, 2005). Da jedoch die modifizierte Kinase Don3^{M157A} biologisch aktiv war, konnte auf eine solche zusätzliche Mutation in dieser Arbeit verzichtet werden.

Die Inhibierung dieser Kinase führte zu einem Phänotyp, der dem einer Deletionsmutante von *don3* entsprach. Die Lokalisierung der Kinase wurde dabei durch die Inhibierung nicht gestört (nicht gezeigt). Die Beteiligung von Don3 an der Zelltrennung wird zu einem bestimmten Zeitpunkt des Zellzyklus für die Ausbildung des sekundären Septums benötigt. Durch Reaktivierung der Kinase konnte gezeigt werden, dass es Don3 auch nach diesem Zeitpunkt, unabhängig des Zellzyklus möglich ist, die blockierte Zelltrennung erfolgreich zu vollenden. Dies zeigt, dass in *U. maydis* die Zytokinese und die von Don3 regulierte Zelltrennung zwei unabhängige Prozesse darstellen, die nicht zwingend zur selben Zeit stattfinden müssen. Eine vergleichbare Beobachtung wurde in Hefe gemacht, wo die Prozesse der Kernteilung und der Knospenbildung teilweise voneinander entkoppelt werden können (Hartwell *et al.*, 1974).

Die Möglichkeiten, die mit der spezifischen Inhibierung der analog-sensitiven Don3 Kinase gegeben waren, ermöglichten die gezielte Untersuchung der zellulären Prozesse, die an der Ausbildung eines Septums beteiligt sind. Zunächst wurde das Zusammenwirken von Don3 und Cdc42 untersucht. Durch sequentielle Inaktivierung der Don3 Kinase und Induktion der Expression der kleinen GTPase Cdc42 konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Don3 Kinase vor der Wirkung von Cdc42 benötigt wird. Zudem war bereits bekannt, dass eine konstitutiv aktive Version der kleinen GTPase Cdc42 in der Lage ist, eine *don1*- aber nicht eine *don3*-Mutante zu supprimieren (Mahlert *et al.*, 2006). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass Don3 und Cdc42 in zwei unabhängigen Kaskaden wirken. Des Weiteren schloss diese Beobachtung Don1 als ein mögliches Substrat der Don3 Kinase aus.

Obwohl Cdc42 aufgrund der sequentiellen Expression erst Stunden nach der Inaktivierung der Don3 Kinase wirken konnte, waren die Zellen, in denen zuvor Don3 aktiv war, noch in der Lage für eine Runde die Synthese des sekundären Septums und somit die Zelltrennung zu vollziehen. Dabei erscheint es unwahrscheinlich, dass die Phosphorylierung eines Zielproteins durch Don3 über einen solchen Zeitraum innerhalb der Zelle stabil bleibt. Viel eher könnte dies darauf hindeuten, dass die durch Don3 durchgeführte Phosphorylierung die Rekrutierung eines Cdc42-Effektors

zur Folge hat (siehe 3.4). Dessen Lokalisierung könnte Voraussetzung für die spätere Rekrutierung von Cdc42 selbst sein.

Die beobachtete Don3-abhängige Lokalisierung von Cdc42 und die Cdc42-unabhängige Lokalisierung von Don3 innerhalb der Teilungsebene bestärkt die ermittelte Abhängigkeit und Reihenfolge der Don3- und Cdc42-Aktivität. Obwohl das zeitlich getrennte Wirken von Don3 und Cdc42 zur Trennung der Zellen führt, ist nicht auszuschließen, dass eine Rekrutierung von Cdc42 direkt durch Don3 stattfindet. Eine solche Rekrutierung könnte die nachgewiesene Interaktion beider Proteine erklären (Weinzierl *et al.*, 2002). Dies könnte durch die Lokalisierung von Cdc42 in einem Don3-inhibierten anstatt -deletierten Stamm überprüft werden.

Die in der Bäckerhefe für Cdc42 beschriebene Lokalisierung an der Knospenspitze (Richman *et al.*, 2002) konnte in *U. maydis* jedoch nicht beobachtet werden. Dies bekräftigt die Hypothese, dass die Aufgaben von Cdc42 beim polaren Wachstum und der Knospungsinitiation, wie sie für die Bäckerhefe beschrieben wurde (Adams *et al.*, 1990), in *U. maydis* durch die kleine GTPase Rac1 übernommen worden ist. Somit ist anscheinend Cdc42 in haploiden Sporidien von *U. maydis* hauptsächlich an Prozessen während der Zytokinese beteiligt (Mahlert *et al.*, 2006).

3.4 Don3 und Cdc42 sind essentiell für den Aufbau des sekundären Aktomyosinrings

Für die Untersuchung der Dynamik des Aktomyosinrings wurden in dieser Arbeit Cdc4 (*myosin essential light chain*) und das FCH-Domänen-Protein Cdc15 als Marker verwendet (Fankhauser *et al.*, 1995). Dabei konnte gezeigt werden, dass der Bildung des primären und des sekundären Septums jeweils der Aufbau eines kontraktiven Rings vorausgeht. Die Synthese der Septen fand während der jeweiligen Ringkontraktion statt, wie dies auch bereits für andere Pilze beschrieben worden ist (Cabib *et al.*, 1989).

Sowohl in Don3-inhibierten als auch Cdc42-reprimierten Zellen bildete sich kein sekundärer Aktomyosinring aus. Trotzdem konnte eine Lokalisierung von Cdc4 an der zukünftigen Septierungsstelle während der Don3-Inhibierung beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass in diesen Zellen die Rekrutierung von Komponenten des Aktomyosinrings bereits begonnen hat. In *S. pombe* ist die

Assemblierung der Aktinfilamente des Aktomyosinrings abhängig vom Formin Cdc12 und dem Profilin Cdc3 (Balasubramanian *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1997; Pelham *et al.*, 2002). Eine Interaktion von Cdc42 mit dem Profilin Homolog (UM03300) und dem Formin Homolog Drf1 (UM01141) aus *U. maydis*, konnte bereits in einem 2-Hybrid-Assay gezeigt werden (B. Sandrock, pers. Mitteilung). Somit sind diese Proteine potentielle Effektoren von Cdc42.

Sowohl für die Formine als auch für Profilin wurde bereits eine Regulation durch Phosphorylierung beschrieben (Sathish *et al.*, 2004; Hannemann *et al.*, 2008). Daher könnten diese Proteine Substrate der Don3 Kinase sein. Darüberhinaus werden jedoch viele weitere Ringkomponenten wie z.B. das IQGAP aus *C. albicans* oder Cdc15 aus *S. pombe* über eine Phosphorylierung reguliert (Wachtler *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008). Als Substrat hingegen auszuschließen ist vermutlich Cdc4, da eine Phosphorylierung des Proteins nicht essentiell für dessen Funktion zu sein scheint (McCollum *et al.*, 1999). Die Identifizierung potentieller Zielproteine der Don3 Kinase wurde bereits auf vielfältigste Weise durchgeführt (Böhmer, 2005). Dabei führte ein Hefe-2-Hybrid-Screen zur Identifizierung eines einzigen Interaktionspartners Dip1 (UM03992). Eine Beteiligung dieses Protein an der Zelltrennung konnte jedoch ausgeschlossen werden (Sandrock *et al.*, 2006). Eine Co-Immunopräzipitation nach TAP-tag Aufreinigung zeigte das Vorhandensein von möglichen Interaktionspartnern von Don3 (Böhmer, 2005). Die aufgereinigte Menge erwies sich jedoch als zu gering für eine Identifizierung. Eine Wiederholung des Experiments in einem größeren Maßstab könnte erfolgreich verlaufen. In einem *in vitro* Kinasetest zeigte die aufgereinigte Kinase lediglich eine schwache Aktivität (Böhmer, 2005). Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen wäre es durchaus denkbar, durch Einsatz der analog-spezifischen Kinase Don3^{M157A} zusammen mit einem spezifischen Phosphatdonor wie z.B. einem radioaktiv oder durch Thiophosphat markiertem N⁶-Benzyl-ATPs (Liu *et al.*, 1998; Blethrow *et al.*, 2008), Zielproteine der Kinase zu identifizieren.

3.5 Cdc15 ist essentiell für die Funktion des Aktomyosinrings

Das FCH-Domänen-Protein Cdc15 spielt in der Spalthefe *S. pombe* eine entscheidende Rolle für den Aufbau und die Stabilität des Aktomyosinrings (Kitayama *et al.*, 1997; Balasubramanian *et al.*, 1998; Mulvihill *et al.*, 2000; Carnahan

et al., 2003; Rajagopalan *et al.*, 2003; Wachtler *et al.*, 2006). Während der Kontraktion koordiniert Cdc15 vermutlich die Invagination der Plasmamembran mit der Reorganisation der Aktinstruktur innerhalb des kontraktilen Rings (Aspenström *et al.*, 2006; Chitu *et al.*, 2007). Anders als in *S. pombe* ist eine Deletion des Cdc15-Homologs Hof1 in *S. cerevisiae* nicht letal (Fankhauser *et al.*, 1995). Die Zellen sind jedoch nicht fähig, eine korrekte Zytokinese zu vollziehen, enthalten mehrere Zellkerne und weisen eine verstärkte Chitineinlagerung verteilt über die gesamte Zellwand auf (Kamei *et al.*, 1998). Da in *S. cerevisiae* anders als in *S. pombe* die Zytokinese unabhängig von der Bildung eines Aktomyosinrings stattfinden kann, scheint die Instabilität des Aktomyosinrings nicht der einzige Grund für diese Effekte zu sein (Bi *et al.*, 1998; Lippincott *et al.*, 1998). In *U. maydis* führte die Deletion von Cdc15 ebenfalls zu einem Zytokinese- und Trennungsdefekt, jedoch waren diese Zellen noch in der Lage, einen stabilen Aktomyosinring auszubilden. Dieser war jedoch nicht funktional, da eine Kontraktion ausblieb. Die Anwesenheit eines gemeinsamen Zytoplasmas zwischen benachbarten Zellen und die inkorrekte Chitinanlagerung im Bereich zwischen Mutter- und Tochterzelle (nicht gezeigt) lassen darauf schließen, dass weder eine Fusion der Plasmamembran noch die Ausbildung eines funktionalen Septums stattgefunden hat. Allerdings waren *cdc15*-Mutanten nicht in der Lage, ihren distalen Pol für die Ausbildung von mehr als einer neuen Zelle zu verwenden. Deshalb wurden die nachfolgenden Knospen lateral und oft in der Mitte der Zelle ausgebildet. Dieses Wachstumsverhalten erinnert an sogenannte T-förmige Mutanten der Spalthefe *S. pombe*. Diese Mutanten zeigen zwar polares Wachstum, dies jedoch entlang von mehr als einer Zellachse (Nurse, 1994; Mata *et al.*, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass in den meisten Mutanten, die diese Morphologie vorweisen, die Funktion bzw. die Ausrichtung der Mikrotubuli gestört ist und dies Ursache für die Ausbildung der lateralen Zellachse ist (Hayles *et al.*, 2001). Daher könnte eine inkorrekte Ausrichtung der Mikrotubuli in den *cdc15*-Mutanten, Ursache für die gestörte Verteilung der Kerne in laterale Zellen sein. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass der korrekte Abschluss der Zytokinese Voraussetzung für die Ausrichtung der Mikrotubuli und für die Etablierung der Zellachse ist.

3.6 Der Septincollar dient als Gerüst für Cdc4 aber nicht für Cdc15

Im Gegensatz zum FCH-Domänen-Protein Cdc15 lokalisierte Cdc4 (*myosin essential light chain*) nach Inhibierung der Don3 Kinase an dem stabilen Septincollar. Nach Entfernung des Inhibitors und dem Abbau der Septinstrukturen vollzogen die angelagerten Cdc4 Proteine eine Umwandlung in eine Ringstruktur. Zugleich wurde Cdc15 in den Ring rekrutiert und anschließend erfolgte die Kontraktion. Diese Reihenfolge konnte in einer Filmstudie und durch die Analyse von wildtypischen Zellen bestätigt werden. Dabei konnte zu keinem Zeitpunkt eine Kolo-kalisierung zwischen Cdc15 und dem Septincollar beobachtet werden. Auch in *S. pombe* werden nicht alle Ringkomponenten gleichzeitig rekrutiert und Cdc4 erscheint vor Cdc15 am Ort der Septierung (Wu *et al.*, 2003). Da die Ausbildung des Myosinrings unabhängig von polymerisiertem Aktin stattfindet, aber zugleich septinspezifisch ist (Bi *et al.*, 1998) kann spekuliert werden, dass der Septincollar lediglich als Gerüst für Komponenten des Myosinrings dient und der letztliche Zusammenbau zu einem funktionalen Aktomyosinring mittels Aktinpolymerisation und Rekrutierung von Cdc15, durch den Abbau des Septincollars eingeleitet wird. Der zeitliche Verlauf der Lokalisierung weiterer bekannter Komponenten des kontraktiven Rings (z.B. Profilin Cdc3, Rlc1 (*myosin regulatory light chain*) oder die Tropomyosine Tpm1 und Tpm2) und vor allem des Aktins könnte weitere Rückschlüsse über die Selektivität und Funktion des Septincollars in *U. maydis* geben.

3.7 Modell der Septierung in *U. maydis*

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass die Ausbildung der beiden Septen während der Zytokinese und Zelltrennung nach einem sehr ähnlichen Mechanismus abläuft. Die Synthese der Septen erfolgt jeweils durch sequentielle Assemblierung eines Septincollars, eines Aktomyosin- und eines Septinrings. Die Deletion des FCH-Domänen-Proteins Cdc15 wirkt sich gleichermaßen auf beide Septierungen aus. Beide Aktomyosinringe waren nicht funktional und daher konnte weder ein primärer noch ein sekundärer Septinring ausgebildet werden.

Lediglich bei der Regulation des primären und sekundären Septums scheinen unterschiedliche Proteine beteiligt zu sein. Da in *U. maydis* die Deletion der kleinen GTPase Rac1 bewirkt, dass sich die Zellen durch ein einzelnes, zentrales Septum

teilen (Mahlert *et al.*, 2006), könnte spekuliert werden, dass Rac1 zusammen mit seinem Effektor, der p21-aktivierten Kinase Cla4, die Initiierung des primären Septums veranlasst (Mahlert *et al.*, 2006). Kann dieses nicht ausgebildet werden, findet eine Art Ersatzteilung mittels eines zentral angelegten „sekundären“ Septums statt. Auch in der Bäckerhefe ist Cla4 zusammen mit dem Aktivator Cdc42 an der Ausbildung des Septums beteiligt. Eine Deletion der Kinase führt zu einem Zytokinesedefekt und zur Clusterbildung von nichtgetrennten Zellen (Cvrckova *et al.*, 1995; Benton *et al.*, 1997).

Für die Regulation und den Ablauf der Septierung in *U. maydis* kann daher folgendes Modell postuliert werden: An der zukünftigen Septierungsstelle wird ein Septincollar angelegt (Abb. 14, a; rot). Dieser Septincollar dient als Gerüst für einige der Proteine, die an der Septierung beteiligt sind, wie z.B. Cdc4 (Abb. 14, b; grüne Kreise). Weitere Komponenten wie Cdc15 bleiben in dieser Phase im Zytoplasma (Abb. 14, b; grüne Ovale). Der Abbau des Septincollars (Abb. 14, c) ist Voraussetzung für die Rekrutierung der zytoplasmatischen Komponenten und ihrer Assemblierung zu einem kontraktilen Aktomyosinring (Abb. 14, d). Dieser wiederum wirkt als Matrice für den Wiederaufbau der Septinfilamente in Form einer Ringstruktur (Abb. 14, e; rot). Dabei wird diese Septinstruktur vermutlich nur auf einer Seite des kontraktilen Rings angelegt. Während der Kontraktion des Aktomyosinrings findet eine zentripetale Synthese des Septums statt (Abb. 14, f; blau). Ist dieser Schritt abgeschlossen wird anschließend der kontraktile Ring aufgelöst (Abb. 14, g). Im Gegensatz dazu bleibt der Septinring für eine Weile stabil, bevor auch dieser zerfällt (Abb. 14, h).

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass für die Synthese des sekundären Septums sowohl die Aktivität der Don3 Kinase als auch die der kleinen GTPase Cdc42 zwischen den Schritten 14 b und 14 c benötigt wird. Die Rolle, die beide Proteine dabei für die Assemblierung des kontraktilen Rings einnehmen, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen. Die in dieser Arbeit etablierten Markerproteine für Septin- und Aktomyosindynamiken können auch in Zukunft dazu dienen, die genaue Funktion der kleinen GTPase Rac1 und die der p21-aktivierten Kinase Cla4 während der Ausbildung des primären Septums zu ermitteln.

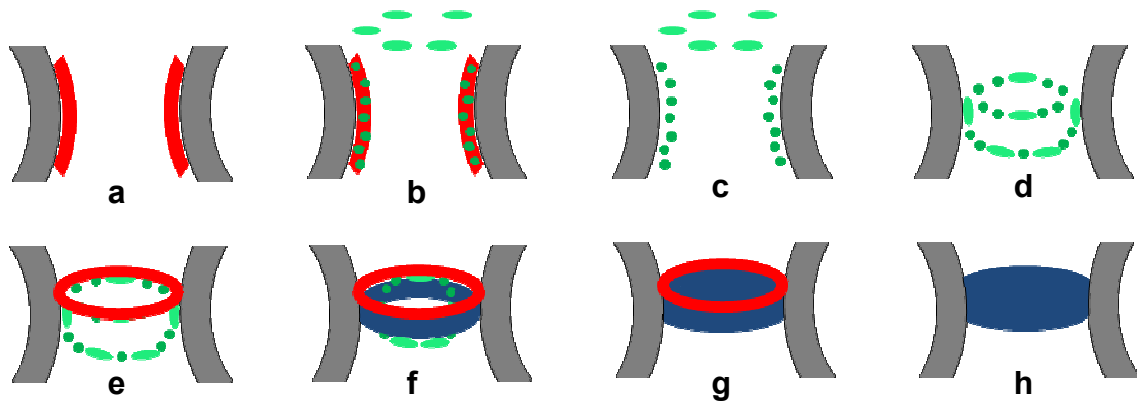


Abb. 14: Modell der Septierung während der Zellteilung von *U. maydis*. **a**, An der zukünftigen Septierungsstelle (grau) wird ein Septincollar angelegt (rot). **b**, Dieser dient als Gerüst für einige Proteine, die an der Septierung beteiligt sind, u. a. Cdc4 (grüne Kreise). Andere Komponenten wie Cdc15 (grüne Ovale) lokalisieren in dieser Phase im Zytoplasma. **c**, Der Abbau des Septincollars ist Voraussetzung für die Rekrutierung der zytoplasmatischen Komponenten **d**, und der Assemblierung des kontraktiven Rings. **e**, Dieser wiederum wirkt selbst als Matrice für den Aufbau der Septinfilamente in Form einer Ringstruktur (rot). **f**, Während der Kontraktion des Aktomyosinrings findet die zentripetale Synthese des Septums statt (blau). **g**, Nach der Vollendung des Septums verschwindet der kontraktile Ring. Im Gegensatz dazu bleibt der Septincollar für kurze Zeit stabil, **h**, bevor auch dieser zerfällt.

3.8 Die Proteinkinase Gin4 bestimmt die Positionierung der Septen durch die Ausbildung eines septinfreien Bereichs

Die Deletion der Proteinkinase Gin4 führt in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* zu einem Zelltrennungsdefekt, der auf eine gestörte Septinorganisation zurückzuführen ist (Longtine *et al.*, 1998; Mortensen *et al.*, 2002). Ausgehend von dieser Beobachtung wurde in dieser Arbeit die Funktion dieser Kinase im Hinblick auf die Septindynamik in *U. maydis* untersucht. Die Deletion von *gin4* führt in *U. maydis* ebenfalls zu einem Zelltrennungsdefekt. Weiterhin konnte in diesen Zellen durch fluoreszenzmikroskopische Analyse des Septins Cdc10-RFP eine gestörte Septindynamik beobachtet werden. Obwohl die Ausbildung des Septincollars zu Beginn der Knospung normal verlief, fand keine Umwandlung in einen Ring statt (siehe Publikation 2). Vielmehr kam es vor, dass sogar Zellen, die bereits eigene Töchter ausgebildet hatten, an ihrem distalen Ende immer noch einen stabilen Septincollar aufwiesen. Interessanterweise dienten diese stabilen Septincollar nicht zum Aufbau eines Septums. Trotzdem waren die Zellen weiterhin in der Lage, Septen zu synthetisieren. Jedoch fand diese Septierung an zufälligen Stellen unter Bildung eines transienten Septincollars statt. Durch die falsche Positionierung der

Septen war es den Zellen nicht möglich, eine Fragmentierungszone auszubilden, was zur Verhinderung einer normalen Zelltrennung führte.

Durch die gleichzeitige Inhibierung der analog-sensitiven Version der Don3 Kinase konnte gezeigt werden, dass *gin4*-Mutanten in der Lage sind, sowohl primäre als auch sekundäre Septen, wenn auch falsch positioniert, auszubilden. Die Trennung der *gin4*-Zellen findet vermutlich über einen Mechanismus statt, wie er auch für Deletionsmutanten der p21-aktivierten Proteinkinase Cla4 beobachtet wurde. *cla4*-Mutanten bilden ein zentrales Septum durch dessen Einschnürung und Spaltung die Zellen getrennt werden (Leveleki *et al.*, 2004). Eine interessante Frage ist, ob die falsche Positionierung der Septen in den *gin4*-Mutanten zu einer gestörten Kernverteilung führt. Dies könnte durch eine DAPI-Färbung überprüft werden.

Nach diesen Beobachtungen stellt sich die Frage, auf welche Weise Gin4 an der Positionierung beteiligt ist. Erste Hinweise konnten durch die Lokalisierung der Kinase erbracht werden.

In *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass Gin4 vor und zu Beginn der Knospung mit Septinen kolokalisiert, im Gegensatz zu diesen die Knospungszone jedoch zu Beginn der Zytokinese verlässt (Longtine *et al.*, 1998). Eine ähnliche Lokalisierung zeigte die Gin4 Kinase in *U. maydis*. Gin4 kolokalisierte nur mit einem Teil des bei der Knospung angelegten Septincollars, in der Mitte der Septinstruktur. Nachdem Gin4 eine breitere und somit dem Septincollar entsprechende Lokalisierung eingenommen hatte, wurde der Abbau des Septincollars beobachtet. Daran anschließend markierte der Gin4-Collar einen septinfreien Bereich, bei dem es sich der Lage nach vermutlich um die zukünftige, ebenfalls septinfreie Fragmentierungszone handelt. Unmittelbar neben dem Gin4-Collar konnte die Bildung eines neuen Septincollars beobachtet werden. Bevor dieser die Umwandlung in einen Septinring und die Ausbildung des primären Septums vollzogen hatte, verschwand der Gin4-Collar.

Zusammenfassend kann daher postuliert werden, dass es in *U. maydis* während der Zellteilung zur Ausbildung von drei verschiedenen Septincollars kommt. Der bei der frühen Knospung angelegte „Knospungscollar“ ist für die Stabilität der Knospungsstelle zuständig und markiert die spätere Fragmentierungszone (Abb. 15, b; rot). Bei diesem Septincollar handelt es sich jedoch nicht wie bisher angenommen um die Struktur, die als Gerüst für Komponenten des primären Aktomyosinrings dient. Vielmehr fungieren die Septine des Knospungscollars als Zielprotein für die septinspezifische Proteinkinase Gin4 (Abb. 15, c; grün). Diese sorgt nicht nur für den

Abbau des Knospungscollars (Abb. 15, d) sondern auch für die Einrichtung des septinfreien Bereichs (Abb. 15, e). Dieser Bereich dient zur Abgrenzung der für die Septierung benötigten beiden anderen Septincollars. Diese werden sukzessiv direkt neben dem septinfreien Bereich aufgebaut, zuerst auf der Seite der Mutterzelle (primärer Collar) anschließend auf Seiten der Tochterzelle (sekundärer Collar) (Abb. 15, e-g; rot). Daraufhin fungieren diese wie in Abbildung 14 beschrieben für die Ausbildung eines Septums.

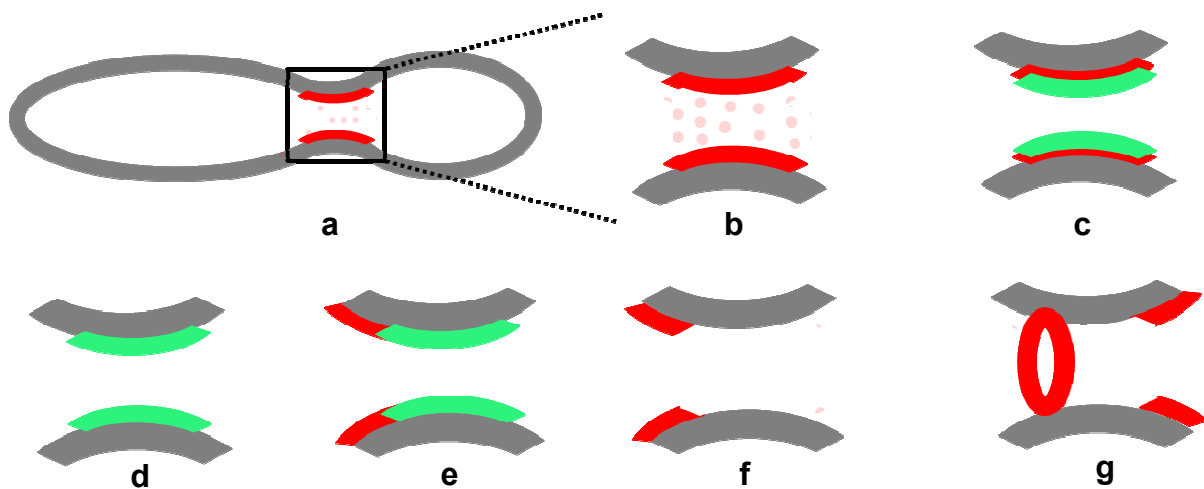


Abb. 15: Modell der Positionierung der Septincollars während der Zellteilung von *U. maydis*. a, Dargestellt ist der Umriss einer knospenden Zelle. Die hellen Punkte symbolisieren zytoplasmatische Septine. In der Teilungsebene (schwarzer Kasten) ist bereits der Knospungscollar angelegt (rot). Eine Vergrößerung dieser Teilungsebene ist in b-g dargestellt. b, Ausschnitt der Teilungsebene aus a. c, Die Proteinkinase Gin4 (grün) lokalisiert am Knospungscollar d, Der Knospungscollar wird durch die Aktivität der Gin4 Kinase abgebaut e, Unmittelbar neben dem Gin4-Collar kann innerhalb der Mutterzelle die Ausbildung des primären Septincollars beobachtet werden. Gleichzeitig erfolgt die Etablierung der septinfreien Fragmentierungszone. f, Darauf folgend findet der Abbau des Gin4-Collars statt. g, Während der primäre Septincollar bereits die Umwandlung in einen Ring vollzogen hat, wird der sekundäre Septincollar innerhalb der Tochterzelle, direkt neben der septinfreien Fragmentierungszone, aufgebaut.

In der Bäckerhefe kommt es ebenfalls während der Zytokinese zur Ausbildung eines septinfreien Bereichs. Es wurde postuliert, dass dieser während oder durch die Aufspaltung des Septincollars in zwei getrennte Ringe angelegt wird. Wie dieser Prozess abläuft, konnte bisher nicht gezeigt werden. Daher kann wiederum spekuliert werden, dass es sich in der Bäckerhefe bei der Umwandlung des Septincollars in zwei getrennte Septinringe nicht um eine Rotation der Septinfilamente, sondern um einen durch die Proteinkinase Gin4 ausgelösten Abbau des Septincollars und einen Neuaufbau der beobachteten Septinringe handelt.

Es kann vermutet werden, dass der beobachtete Abbau des Knospungscollars in *U. maydis* eine direkte Auswirkung der Gin4 Aktivität darstellt. Allerdings stellt sich die Frage, wie die septinfreie Fragmentierungszone nach dem Abbau des Gin4-Collars aufrechterhalten wird. Dies könnte durch die Anwesenheit endosomaler Vesikel geschehen, die genau zu diesem Zeitpunkt innerhalb der Fragmentierungszone akkumulieren und dort das Zytoplasma weitgehend verdrängen (Schink *et al.*, 2008).

In Abwesenheit der Gin4 Kinase war es den Zellen weder möglich den Knospungscollar abzubauen noch den septinfreien Bereich zu etablieren. Beide Vorgänge scheinen jedoch Voraussetzung für die korrekte Positionierung sowohl des primären als auch des sekundären Collars, sowie für die Akkumulation der endosomalen Vesikel zu sein.

In der Bäckerhefe erfüllt die Gin4 Proteinkinase ebenfalls eine septinorganisierende Funktion. Hier führt die Deletion der Kinase dazu, dass der während der Knospung angelegte Septincollar eine aufgelockerte Form einnimmt und seine kompakte Organisation verliert (Longtine *et al.*, 1998). Daher ist es durchaus möglich, dass die in der Bäckerhefe beobachtete aufgelockerte Form des Septincollars nicht Folge einer Fehlorganisation ist, sondern vielmehr die Folge eines unvollständigen Abbaus. Einen weiteren Hinweis dafür liefert die Beobachtung, dass der in *gin4*-Mutanten der Bäckerhefe gebildete Septincollar zunächst stabil und korrekt organisiert ist und erst in Zellen mit großen Knospen, also den Zellen, die zur Zytokinese und zum Abbau des Septincollars bereit sind, aufgelockert und fehlorganisiert vorliegt (Dobbelaere *et al.*, 2003). Zudem konnte bereits für die Phosphorylierung des Septins Cdc3 durch die Cyclin-abhängige Kinase Cdc28 eine destabilisierende Funktion beschrieben werden (Tang *et al.*, 2002).

Weiterhin führt die erhöhte Expression der Gin4 Kinase in der Bäckerhefe zu einem Phänotyp, der dem einer Septinmutante ähnelt (Longtine *et al.*, 1998). Dies spricht zusätzlich für eine septinabbauende und nicht für eine stabilisierende Funktion der Kinase. Zu überprüfen bleibt, ob eine extrem hohe Expression der Kinase in *U. maydis* ebenfalls zu einem der Septinmutante ähnlichen Phänotyp führt. Dies könnte durch Einsatz des stärkeren *crg*-Promotors überprüft werden. Zusätzlich sollte analysiert werden, welche Septine von Gin4 in *U. maydis* modifiziert werden. Bisher konnte die direkte Phosphorylierung des Septins Shs1 der Bäckerhefe und des Septins Cdc11 aus *Candida albicans* nachgewiesen werden (Mortensen *et al.*,

2002; Dobbelaere *et al.*, 2003; Sinha *et al.*, 2007). Eine Identifizierung der durch Gin4 phosphorylierten Septine in *U. maydis* könnte zusätzliche Hinweise über die Spezifität der Kinase liefern. Nichtsdestotrotz sollte die Frage geklärt werden, ob der vermutete Abbau des Knospungscollars durch die Aktivität der Gin4 Kinase oder durch deren reine Septin-Interaktion stattfindet. Durch die Anwendung der in dieser Arbeit für *U. maydis* etablierten chemisch-genetischen Methode, könnte diese Frage geklärt werden. Mithilfe eines fluoreszierenden Fusionsprotein einer analog-sensitiven Version der Gin4 Kinase, könnte darüberhinaus überprüft werden, ob diese im inhibierten Zustand an den stabilen Knospungscollar lokalisiert oder nicht.

3.9 Die regulatorische Untereinheit der Proteinphosphatase 2A, Rts1, reguliert den Abbau des sekundären Septincollars

Die Proteinphosphatase 2A übernimmt wichtige Funktionen in intrazellulären Prozessen wie DNA-Replikation, Transkription, Signaltransduktion und intermediärem Metabolismus (Cohen, 1989; Mumby *et al.*, 1993; Depaoli-Roach *et al.*, 1994). Dabei besteht die Proteinphosphatase 2A aus drei verschiedenen Untereinheiten: einer katalytischen Untereinheit von ca. 36 kDa (C), einer strukturellen Untereinheit von ca. 65 kDa (A) und einer regulatorischen Untereinheit (B), die eine große Variabilität aufweist und deren Größe von 53 kDa bis zu mehr als 100 kDa variieren kann (Shu *et al.*, 1997). Dieser Proteinkomplex kommt in der Zelle in einer Vielzahl von heterotrimeren Formen vor, die sich jeweils in ihrer assoziierten regulatorischen B' Untereinheit unterscheiden. Es konnte gezeigt werden, dass sich die verschiedenen B' regulatorischen Untereinheiten nicht in ihrer Funktion komplementieren können, sondern die Proteinphosphatase 2A zu ihren unterschiedlichen zellulären Zielen hinführen (Zhao *et al.*, 1997).

Eine dieser regulatorischen Untereinheiten ist das Protein Rts1 aus *S. cerevisiae*. Diese Untereinheit reguliert in der Bäckerhefe den Abbau der geteilten Septinringe nach Abschluss der Zytokinese (Dobbelaere *et al.*, 2003). Die Deletion von *rts1* führt zur Ausbildung von Zellen mit stabilen Septinringen. Obwohl die Zellen in der Lage sind, alle benötigten Septen korrekt auszubilden und auch zu degradieren (siehe 1.2), zeigen diese einen Trennungsdefekt. Es wurde daher postuliert, dass der Abbau der Septinringe eine Rolle für die Abschnürung (Abcission) spielt.

In *U. maydis* führte die Deletion des *rts1*-Gens ebenfalls zu einem Zelltrennungsdefekt, auch wenn die Mutanten noch in der Lage waren, beide Septen korrekt auszubilden. Im Gegensatz zur Bäckerhefe blieb in *U. maydis* der Septinring nach der Zytokinese nur auf der Seite der Mutterzelle stabil. Somit konnte neben den Don-Proteinen und der kleinen GTPase Cdc42 ein weiteres Protein identifiziert werden, welches in *U. maydis* spezifisch während der Ausbildung des sekundären Septums wirkt. Nach Inhibierung der analog-sensitiven Don3 Kinase in einer *rts1*-Mutante, blieb die Ausbildung stabiler Septinringe aus. Dies zeigt, dass Rts1 erst nach der Aktivität der Don3 Kinase seine Funktion während der sekundären Septierung ausübt.

Zusammengefasst lassen diese Beobachtungen vermuten, dass in *U. maydis* eine weitere Untereinheit von PP2A vorkommen muss, welche den Abbau des primären Septinrings reguliert. Nichtsdestotrotz scheint der Abbau beider Septinringe Voraussetzung für die korrekte Durchführung der Zelltrennung zu sein.

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung einer Überexpression der Rts1-Untereinheit beobachtet. Interessanterweise führte diese zu einem Phänotyp, der dem einer Septinmutante entsprach. Die Zellen wiesen eine zitronenförmige Zellmorphologie auf und teilen sich durch ein einzelnes, zentrales Septum. Da die regulatorischen Untereinheiten der PP2A deren Spezifität vor allem durch Lokalisierung festlegen, ist davon auszugehen, dass eine Überexpression der regulatorischen Untereinheit zu einer Hyperaktivität der Phosphatase geführt hat und dadurch in diesen Zellen Zielproteine ständig dephosphoryliert werden. Dies führt dann vermutlich zu einem Funktionsverlust von zumindest einem der vier Septine aus *U. maydis*, möglicherweise Cdc11. Trotzdem bildeten die Zellen eine zentrale Septinstruktur aus, an der zusätzlich das Rts1 Protein lokalisierte. Aufgrund dieser Beobachtung kann eine direkte Interaktion zwischen der Septinstruktur und dem Rts1 Protein postuliert werden. Zusätzlich lässt dies vermuten, dass auch Zellen denen lediglich die Funktion eines der Septine fehlt, weiterhin in der Lage sind, eine zentrale Septinstruktur aus den restlichen drei Septinen auszubilden. Dies wäre durchaus möglich, da z.B. in *Caenorhabditis elegans* alle Septinstrukturen aus nur zwei verschiedenen Septinen gebildet werden (Nguyen *et al.*, 2000). Aus welchen Septinen diese Struktur aufgebaut ist, könnte die Expression von weiteren fluoreszierenden Proteinen der Septine Cdc3, Cdc11 und Cdc12 beantworten. Es kann vermutet werden, dass auch *rac1*- und Septinmutanten, die sich auch jeweils

durch ein zentrales Septum teilen, hierfür eine zentrale Septinstruktur ausbilden. Die Analyse von Septindynamiken in diesen Zellen könnte weitere Erkenntnisse über die Aufgabe der Septine liefern.

Ausgehend von den Ergebnissen, die für die Proteinkinase Gin4 und für die regulatorische Untereinheit der Proteinphosphatase 2A, Rts1 gezeigt wurden, kann postuliert werden, dass beide Proteine während der Zelltrennung regulatorisch auf die Dynamik von Septinen wirken. Interessanterweise demonstrieren diese Ergebnisse eine komplexe regulatorische Funktion für die posttranslationale Modifikation von Septinen sowohl durch Phosphorylierung als auch Dephosphorylierung. Sowohl die Modifizierung durch Gin4 als auch die durch Rts1 herbeigeführte Dephosphorylierung haben vermutlich den Abbau der Septinstruktur zur Folge. Daher kann spekuliert werden, dass Septine abhängig eines bestimmten Phosphorylierungsmusters unterschiedliche Strukturen einnehmen, unabhängig davon, ob diese durch eine Phosphorylierung oder Dephosphorylierung herbeigeführt werden. Die dann eingenommene Struktur der Septinfilamente legt die Affinität gegenüber weiteren Interaktionspartnern fest.

3.10 Ausblick

Sowohl für eine Vielzahl von Pilzen als auch für unterschiedliche Vielzeller wie dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* oder der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* bis hin zu Säugetieren, konnte eine Polymerisierung von Septinfilamenten und damit einhergehend die Bildung von vielfältigen Makrostrukturen nachgewiesen werden. Abhängig von deren Form und Lokalisierung erfüllen diese Strukturen in diesen Organismen eine große Anzahl von unterschiedlichen Funktionen. Dabei ist die dynamische Umwandlung zwischen verschiedenen Strukturen eine Schlüsseleigenschaft für die Funktion der Septinfilamente.

In dieser Arbeit konnte anschaulich gezeigt werden, dass die regulierte Umwandlung von Septinstrukturen auf deren schnellen Abbau und Wiederaufbau beruhen kann. Somit eröffnen diese Ergebnisse eine neue Sichtweise der Dynamik von Septinstrukturen, welche in zukünftigen Arbeiten berücksichtigt werden sollte.

4 Literaturverzeichnis

- Adams, A. E., Johnson, D. I., Longnecker, R. M., Sloat, B. F. and Pringle, J. R. (1990). CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **111**, 131-42.
- An, H., Morrell, J. L., Jennings, J. L., Link, A. J. and Gould, K. L. (2004). Requirements of fission yeast septins for complex formation, localization, and function. *Mol Biol Cell* **15**, 5551-64.
- Aspenström, P., Fransson, A. and Richnau, N. (2006). Pombe Cdc15 homology proteins: regulators of membrane dynamics and the actin cytoskeleton. *Trends Biochem Sci* **31**, 670-9.
- Balasubramanian, M. K., Hirani, B. R., Burke, J. D. and Gould, K. L. (1994). The *Schizosaccharomyces pombe* cdc3+ gene encodes a profilin essential for cytokinesis. *J Cell Biol* **125**, 1289-301.
- Balasubramanian, M. K., McCollum, D., Chang, L., Wong, K. C., Naqvi, N. I., He, X., Sazer, S. and Gould, K. L. (1998). Isolation and characterization of new fission yeast cytokinesis mutants. *Genetics* **149**, 1265-75.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (2002). Bud morphogenesis and the actin and microtubule cytoskeletons during budding in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **37**, 149-70.
- Banuett, F., Quintanilla, R. H., Jr. and Reynaga-Pena, C. G. (2008). The machinery for cell polarity, cell morphogenesis, and the cytoskeleton in the Basidiomycete fungus *Ustilago maydis*-a survey of the genome sequence. *Fungal Genet Biol* **45 Suppl 1**, S3-S14.
- Barr, F. A. and Gruneberg, U. (2007). Cytokinesis: placing and making the final cut. *Cell* **131**, 847-60.
- Barral, Y., Mermall, V., Mooseker, M. S. and Snyder, M. (2000). Compartmentalization of the cell cortex by septins is required for maintenance of cell polarity in yeast. *Mol Cell* **5**, 841-51.
- Barral, Y., Parra, M., Bidlingmaier, S. and Snyder, M. (1999). Nim1-related kinases coordinate cell cycle progression with the organization of the peripheral cytoskeleton in yeast. *Genes Dev* **13**, 176-87.
- Benton, B. K., Tinkelenberg, A., Gonzalez, I. and Cross, F. R. (1997). Cla4p, a *Saccharomyces cerevisiae* Cdc42p-activated kinase involved in cytokinesis, is activated at mitosis. *Mol Cell Biol* **17**, 5067-76.
- Bi, E., Maddox, P., Lew, D. J., Salmon, E. D., McMillan, J. N., Yeh, E. and Pringle, J. R. (1998). Involvement of an actomyosin contractile ring in *Saccharomyces cerevisiae* cytokinesis. *J Cell Biol* **142**, 1301-12.
- Bi, E., Maddox, P., Lew, D. J., Salmon, E. D., McMillan, J. N., Yeh, E. and Pringle, J. R. (1998). Involvement of an actomyosin contractile ring in *Saccharomyces cerevisiae* cytokinesis. *J Cell Biol* **142**, 1301-12.
- Bielak-Zmijewska, A., Kolano, A., Szczepanska, K., Maleszewski, M. and Borsuk, E. (2008). Cdc42 protein acts upstream of IQGAP1 and regulates cytokinesis in mouse oocytes and embryos. *Dev Biol* **322**, 21-32.
- Bishop, A. C., Buzko, O. and Shokat, K. M. (2001). Magic bullets for protein kinases. *Trends Cell Biol* **11**, 167-72.
- Bishop, A. C., Shah, K., Liu, Y., Witucki, L., Kung, C. and Shokat, K. M. (1998). Design of allele-specific inhibitors to probe protein kinase signaling. *Curr Biol* **8**, 257-66.
- Bishop, A. C. and Shokat, K. M. (1999). Acquisition of inhibitor-sensitive protein kinases through protein design. *Pharmacol Ther* **82**, 337-46.
- Bishop, A. C., Ubersax, J. A., Petsch, D. T., Matheos, D. P., Gray, N. S., Blethrow, J., Shimizu, E., Tsien, J. Z., Schultz, P. G., Rose, M. D., Wood, J. L., Morgan, D. O. and Shokat, K. M. (2000). A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase. *Nature* **407**, 395-401.
- Blethrow, J. D., Glavy, J. S., Morgan, D. O. and Shokat, K. M. (2008). Covalent capture of kinase-specific phosphopeptides reveals Cdk1-cyclin B substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 1442-7.

- Böhmer, C. (2005). Suche nach Zielproteinen und Interaktionspartnern der Don3-Proteinkinase aus *Ustilago maydis*, Fachbereich Biologie - Molekulargenetik, Philipps-Universität Marburg.
- Böhmer, M. (2002). Suche nach Zielproteinen der Don3-Proteinkinase aus *Ustilago maydis*, Fachbereich Biologie - Molekulargenetik, Philipps-Universität Marburg.
- Boyce, K. J., Chang, H., D'Souza, C. A. and Kronstad, J. W. (2005). An *Ustilago maydis* septin is required for filamentous growth in culture and for full symptom development on maize. *Eukaryot Cell* **4**, 2044-56.
- Burgess, D. R. and Chang, F. (2005). Site selection for the cleavage furrow at cytokinesis. *Trends Cell Biol* **15**, 156-62.
- Byers, B. and Goetsch, L. (1976). A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. *J Cell Biol* **69**, 717-21.
- Cabib, E. (2004). The septation apparatus, a chitin-requiring machine in budding yeast. *Arch Biochem Biophys* **426**, 201-7.
- Cabib, E., Sburlati, A., Bowers, B. and Silverman, S. J. (1989). Chitin synthase 1, an auxiliary enzyme for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **108**, 1665-72.
- Carnahan, R. H. and Gould, K. L. (2003). The PCH family protein, Cdc15p, recruits two F-actin nucleation pathways to coordinate cytokinetic actin ring formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Biol* **162**, 851-62.
- Carroll, A. S., Bishop, A. C., DeRisi, J. L., Shokat, K. M. and O'Shea, E. K. (2001). Chemical inhibition of the Pho85 cyclin-dependent kinase reveals a role in the environmental stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12578-83.
- Causton, H. C., Ren, B., Koh, S. S., Harbison, C. T., Kanin, E., Jennings, E. G., Lee, T. I., True, H. L., Lander, E. S. and Young, R. A. (2001). Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell* **12**, 323-37.
- Chang, F., Drubin, D. and Nurse, P. (1997). cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin. *J Cell Biol* **137**, 169-82.
- Chang, F., Woollard, A. and Nurse, P. (1996). Isolation and characterization of fission yeast mutants defective in the assembly and placement of the contractile actin ring. *J Cell Sci* **109** (Pt 1), 131-42.
- Chant, J. (1996). Generation of cell polarity in yeast. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 557-65.
- Chitu, V. and Stanley, E. R. (2007). Pombe Cdc15 homology (PCH) proteins: coordinators of membrane-cytoskeletal interactions. *Trends Cell Biol* **17**, 145-56.
- Cid, V. J., Adamikova, L., Sanchez, M., Molina, M. and Nombela, C. (2001). Cell cycle control of septin ring dynamics in the budding yeast. *Microbiology* **147**, 1437-50.
- Cohen, P. (1989). The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* **58**, 453-508.
- Coll, P. M., Rincon, S. A., Izquierdo, R. A. and Perez, P. (2007). Hob3p, the fission yeast ortholog of human BIN3, localizes Cdc42p to the division site and regulates cytokinesis. *Embo J* **26**, 1865-77.
- Colman-Lerner, A., Chin, T. E. and Brent, R. (2001). Yeast Cbk1 and Mob2 activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates. *Cell* **107**, 739-50.
- Cvrckova, F., De Virgilio, C., Manser, E., Pringle, J. R. and Nasmyth, K. (1995). Ste20-like protein kinases are required for normal localization of cell growth and for cytokinesis in budding yeast. *Genes Dev* **9**, 1817-30.
- Dan, I., Watanabe, N. M. and Kusumi, A. (2001). The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell Biol* **11**, 220-30.
- Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M. and Cohen, P. (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* **351**, 95-105.
- De Virgilio, C., DeMarini, D. J. and Pringle, J. R. (1996). SPR28, a sixth member of the septin gene family in *Saccharomyces cerevisiae* that is expressed specifically in sporulating cells. *Microbiology* **142** (Pt 10), 2897-905.

- Depaoli-Roach, A. A., Park, I. K., Cerovsky, V., Csontos, C., Durbin, S. D., Kuntz, M. J., Sitikov, A., Tang, P. M., Verin, A. and Zolnierowicz, S. (1994). Serine/threonine protein phosphatases in the control of cell function. *Adv Enzyme Regul* **34**, 199-224.
- Dobbelaere, J. and Barral, Y. (2004). Spatial coordination of cytokinetic events by compartmentalization of the cell cortex. *Science* **305**, 393-6.
- Dobbelaere, J., Gentry, M. S., Hallberg, R. L. and Barral, Y. (2003). Phosphorylation-dependent regulation of septin dynamics during the cell cycle. *Dev Cell* **4**, 345-57.
- Errington, J., Daniel, R. A. and Scheffers, D. J. (2003). Cytokinesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 52-65, table of contents.
- Fankhauser, C., Reymond, A., Cerutti, L., Utzig, S., Hofmann, K. and Simanis, V. (1995). The *S. pombe* *cdc15* gene is a key element in the reorganization of F-actin at mitosis. *Cell* **82**, 435-44.
- Faty, M., Fink, M. and Barral, Y. (2002). Septins: a ring to part mother and daughter. *Curr Genet* **41**, 123-31.
- Feierbach, B. and Chang, F. (2001). Cytokinesis and the contractile ring in fission yeast. *Curr Opin Microbiol* **4**, 713-9.
- Field, C. M., al-Awar, O., Rosenblatt, J., Wong, M. L., Alberts, B. and Mitchison, T. J. (1996). A purified *Drosophila* septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity. *J Cell Biol* **133**, 605-16.
- Ford, S. K. and Pringle, J. R. (1991). Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: localization of the CDC11 gene product and the timing of events at the budding site. *Dev Genet* **12**, 281-92.
- Frazier, J. A., Wong, M. L., Longtine, M. S., Pringle, J. R., Mann, M., Mitchison, T. J. and Field, C. (1998). Polymerization of purified yeast septins: evidence that organized filament arrays may not be required for septin function. *J Cell Biol* **143**, 737-49.
- Gale, C., Gerami-Nejad, M., McClellan, M., Vandoninck, S., Longtine, M. S. and Berman, J. (2001). *Candida albicans* Int1p interacts with the septin ring in yeast and hyphal cells. *Mol Biol Cell* **12**, 3538-49.
- Grava, S., Schaerer, F., Faty, M., Philippsen, P. and Barral, Y. (2006). Asymmetric recruitment of dynein to spindle poles and microtubules promotes proper spindle orientation in yeast. *Dev Cell* **10**, 425-39.
- Guertin, D. A., Trautmann, S. and McCollum, D. (2002). Cytokinesis in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 155-78.
- Haarer, B. K. and Pringle, J. R. (1987). Immunofluorescence localization of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck. *Mol Cell Biol* **7**, 3678-87.
- Hall, P. A., Jung, K., Hillan, K. J. and Russell, S. E. (2005). Expression profiling the human septin gene family. *J Pathol* **206**, 269-78.
- Hannemann, S., Madrid, R., Stastna, J., Kitzing, T., Gasteier, J., Schonichen, A., Bouchet, J., Jimenez, A., Geyer, M., Grosse, R., Benichou, S. and Fackler, O. T. (2008). The Diaphanous-related Formin FHOD1 associates with ROCK1 and promotes Src-dependent plasma membrane blebbing. *J Biol Chem* **283**, 27891-903.
- Hartwell, L. H. (1971). Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp Cell Res* **69**, 265-76.
- Hartwell, L. H., Culotti, J., Pringle, J. R. and Reid, B. J. (1974). Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* **183**, 46-51.
- Hartwell, L. H., Culotti, J. and Reid, B. (1970). Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **66**, 352-9.
- Hayles, J. and Nurse, P. (2001). A journey into space. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 647-56.

- Hlubek, A., Schink, K. O., Mahlert, M., Sandrock, B. and Bolker, M. (2008). Selective activation by the guanine nucleotide exchange factor Don1 is a main determinant of Cdc42 signalling specificity in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **68**, 615-23.
- Hsu, S. C., Hazuka, C. D., Roth, R., Foletti, D. L., Heuser, J. and Scheller, R. H. (1998). Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments. *Neuron* **20**, 1111-22.
- Jacobs, C. W., Mattichak, S. J. and Knowles, J. F. (1994). Budding patterns during the cell cycle of the maize smut pathogen *Ustilago maydis*. *Can J Bot* **72**, 1675-1680.
- John, C. M., Hite, R. K., Weirich, C. S., Fitzgerald, D. J., Jawhari, H., Faty, M., Schlapfer, D., Kroschewski, R., Winkler, F. K., Walz, T., Barral, Y. and Steinmetz, M. O. (2007). The *Caenorhabditis elegans* septin complex is nonpolar. *Embo J* **26**, 3296-307.
- Johnson, E. S. and Blobel, G. (1999). Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins. *J Cell Biol* **147**, 981-94.
- Kamasaki, T., Osumi, M. and Mabuchi, I. (2007). Three-dimensional arrangement of F-actin in the contractile ring of fission yeast. *J Cell Biol* **178**, 765-71.
- Kamei, T., Tanaka, K., Hihara, T., Umikawa, M., Imamura, H., Kikyo, M., Ozaki, K. and Takai, Y. (1998). Interaction of Bnr1p with a novel Src homology 3 domain-containing Hof1p. Implication in cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**, 28341-5.
- Kim, H. B., Haarer, B. K. and Pringle, J. R. (1991). Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: localization of the CDC3 gene product and the timing of events at the budding site. *J Cell Biol* **112**, 535-44.
- Kinoshita, M. (2003). Assembly of mammalian septins. *J Biochem* **134**, 491-6.
- Kinoshita, M., Field, C. M., Coughlin, M. L., Straight, A. F. and Mitchison, T. J. (2002). Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins. *Dev Cell* **3**, 791-802.
- Kitayama, C., Sugimoto, A. and Yamamoto, M. (1997). Type II myosin heavy chain encoded by the *myo2* gene composes the contractile ring during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Biol* **137**, 1309-19.
- Krapp, A. and Simanis, V. (2008). An overview of the fission yeast septation initiation network (SIN). *Biochem Soc Trans* **36**, 411-5.
- Kusch, J., Meyer, A., Snyder, M. P. and Barral, Y. (2002). Microtubule capture by the cleavage apparatus is required for proper spindle positioning in yeast. *Genes Dev* **16**, 1627-39.
- Larisch, S., Yi, Y., Lotan, R., Kerner, H., Eimerl, S., Tony Parks, W., Gottfried, Y., Birkey Reffey, S., de Caestecker, M. P., Danielpour, D., Book-Melamed, N., Timberg, R., Duckett, C. S., Lechleider, R. J., Steller, H., Orly, J., Kim, S. J. and Roberts, A. B. (2000). A novel mitochondrial septin-like protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif. *Nat Cell Biol* **2**, 915-21.
- Leveleki, L., Mahlert, M., Sandrock, B. and Bölker, M. (2004). The PAK family kinase Cla4 is required for budding and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **54**, 396-406.
- Li, C. R., Wang, Y. M. and Wang, Y. (2008). The IQGAP Iqg1 is a regulatory target of CDK for cytokinesis in *Candida albicans*. *Embo J* **27**, 2998-3010.
- Lippincott, J. and Li, R. (1998). Sequential assembly of myosin II, an IQGAP-like protein, and filamentous actin to a ring structure involved in budding yeast cytokinesis. *J Cell Biol* **140**, 355-66.
- Lippincott, J., Shannon, K. B., Shou, W., Deshaies, R. J. and Li, R. (2001). The Tem1 small GTPase controls actomyosin and septin dynamics during cytokinesis. *J Cell Sci* **114**, 1379-86.
- Liu, Y., Shah, K., Yang, F., Witucki, L. and Shokat, K. M. (1998). Engineering Src family protein kinases with unnatural nucleotide specificity. *Chem Biol* **5**, 91-101.
- Longtine, M. S., DeMarini, D. J., Valencik, M. L., Al-Awar, O. S., Fares, H., De Virgilio, C. and Pringle, J. R. (1996). The septins: roles in cytokinesis and other processes. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 106-19.

- Longtine, M. S., Fares, H. and Pringle, J. R. (1998). Role of the yeast Gin4p protein kinase in septin assembly and the relationship between septin assembly and septin function. *J Cell Biol* **143**, 719-36.
- Longtine, M. S., Theesfeld, C. L., McMillan, J. N., Weaver, E., Pringle, J. R. and Lew, D. J. (2000). Septin-dependent assembly of a cell cycle-regulatory module in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **20**, 4049-61.
- Mahlert, M., Leveleki, L., Hlubek, A., Sandrock, B. and Böcker, M. (2006). Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **59**, 567-78.
- Martin-Cuadrado, A. B., Morrell, J. L., Konomi, M., An, H., Petit, C., Osumi, M., Balasubramanian, M., Gould, K. L., Del Rey, F. and de Aldana, C. R. (2005). Role of septins and the exocyst complex in the function of hydrolytic enzymes responsible for fission yeast cell separation. *Mol Biol Cell* **16**, 4867-81.
- Martin-Garcia, R. and Valdivieso, M. H. (2006). The fission yeast Chs2 protein interacts with the type-II myosin Myo3p and is required for the integrity of the actomyosin ring. *J Cell Sci* **119**, 2768-79.
- Mata, J. and Nurse, P. (1998). Discovering the poles in yeast. *Trends Cell Biol* **8**, 163-7.
- McCollum, D., Feoktistova, A. and Gould, K. L. (1999). Phosphorylation of the myosin-II light chain does not regulate the timing of cytokinesis in fission yeast. *J Biol Chem* **274**, 17691-5.
- Mendoza, M., Hyman, A. A. and Glotzer, M. (2002). GTP binding induces filament assembly of a recombinant septin. *Curr Biol* **12**, 1858-63.
- Merla, A. and Johnson, D. I. (2000). The Cdc42p GTPase is targeted to the site of cell division in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Cell Biol* **79**, 469-77.
- Miller, P. J. and Johnson, D. I. (1994). Cdc42p GTPase is involved in controlling polarized cell growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* **14**, 1075-83.
- Mortensen, E. M., McDonald, H., Yates, J., 3rd and Kellogg, D. R. (2002). Cell cycle-dependent assembly of a Gin4-septin complex. *Mol Biol Cell* **13**, 2091-105.
- Motegi, F., Nakano, K. and Mabuchi, I. (2000). Molecular mechanism of myosin-II assembly at the division site in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **113** (Pt 10), 1813-25.
- Mulvihill, D. P., Win, T. Z., Pack, T. P. and Hyams, J. S. (2000). Cytokinesis in fission yeast: a myosin pas de deux. *Microsc Res Tech* **49**, 152-60.
- Mumby, M. C. and Walter, G. (1993). Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiol Rev* **73**, 673-99.
- Naqvi, N. I., Eng, K., Gould, K. L. and Balasubramanian, M. K. (1999). Evidence for F-actin-dependent and -independent mechanisms involved in assembly and stability of the medial actomyosin ring in fission yeast. *Embo J* **18**, 854-62.
- Nguyen, T. Q., Sawa, H., Okano, H. and White, J. G. (2000). The *C. elegans* septin genes, *unc-59* and *unc-61*, are required for normal postembryonic cytokinesis and morphogenesis but have no essential function in embryogenesis. *J Cell Sci* **113** Pt 21, 3825-37.
- Norden, C., Liakopoulos, D. and Barral, Y. (2004). Dissection of septin actin interactions using actin overexpression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **53**, 469-83.
- Nurse, P. (1994). Fission yeast morphogenesis--posing the problems. *Mol Biol Cell* **5**, 613-6.
- O'Donnell, K. L. and McLaughlin, D. J. (1984). Postmeiotic mitosis, basidiospore development, and septation in *Ustilago maydis*. *Mycologia* **76**, 486-502.
- Ozsarac, N., Bhattacharyya, M., Dawes, I. W. and Clancy, M. J. (1995). The *SPR3* gene encodes a sporulation-specific homologue of the yeast CDC3/10/11/12 family of bud neck microfilaments and is regulated by ABFI. *Gene* **164**, 157-62.
- Pelham, R. J. and Chang, F. (2002). Actin dynamics in the contractile ring during cytokinesis in fission yeast. *Nature* **419**, 82-6.
- Rajagopalan, S., Wachtler, V. and Balasubramanian, M. (2003). Cytokinesis in fission yeast: a story of rings, rafts and walls. *Trends Genet* **19**, 403-8.

- Richman, T. J., Sawyer, M. M. and Johnson, D. I. (1999). The Cdc42p GTPase is involved in a G2/M morphogenetic checkpoint regulating the apical-isotropic switch and nuclear division in yeast. *J Biol Chem* **274**, 16861-70.
- Richman, T. J., Sawyer, M. M. and Johnson, D. I. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* Cdc42p localizes to cellular membranes and clusters at sites of polarized growth. *Eukaryot Cell* **1**, 458-68.
- Sandrock, B., Bohmer, C. and Bolker, M. (2006). Dual function of the germinal centre kinase Don3 during mitosis and cytokinesis in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*
- Sathish, K., Padma, B., Munugalavadla, V., Bhargavi, V., Radhika, K. V., Wasia, R., Sairam, M. and Singh, S. S. (2004). Phosphorylation of profilin regulates its interaction with actin and poly (L-proline). *Cell Signal* **16**, 589-96.
- Schink, K. O. and Bolker, M. (2008). Coordination of Cytokinesis and Cell Separation by Endosomal Targeting of a Cdc42-specific GEF in *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell*
- Shcheprova, Z., Baldi, S., Frei, S. B., Gonnet, G. and Barral, Y. (2008). A mechanism for asymmetric segregation of age during yeast budding. *Nature* **454**, 728-34.
- Shiomi, D. and Margolin, W. (2007). Dimerization or oligomerization of the actin-like FtsA protein enhances the integrity of the cytokinetic Z ring. *Mol Microbiol* **66**, 1396-415.
- Shu, Y., Yang, H., Hallberg, E. and Hallberg, R. (1997). Molecular genetic analysis of Rts1p, a B' regulatory subunit of *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase 2A. *Mol Cell Biol* **17**, 3242-53.
- Sinha, I., Wang, Y. M., Philp, R., Li, C. R., Yap, W. H. and Wang, Y. (2007). Cyclin-dependent kinases control septin phosphorylation in *Candida albicans* hyphal development. *Dev Cell* **13**, 421-32.
- Sirajuddin, M., Farkasovsky, M., Hauer, F., Kuhlmann, D., Macara, I. G., Weyand, M., Stark, H. and Wittinghofer, A. (2007). Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature* **449**, 311-5.
- Smith, L. G. (2001). Plant cell division: building walls in the right places. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 33-9.
- Steinberg, G. and Perez-Martin, J. (2008). *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends Cell Biol* **18**, 61-7.
- Tang, C. S. and Reed, S. I. (2002). Phosphorylation of the septin cdc3 in g1 by the cdc28 kinase is essential for efficient septin ring disassembly. *Cell Cycle* **1**, 42-9.
- Tasto, J. J., Morrell, J. L. and Gould, K. L. (2003). An anillin homologue, Mid2p, acts during fission yeast cytokinesis to organize the septin ring and promote cell separation. *J Cell Biol* **160**, 1093-103.
- Tran, P. T., Marsh, L., Doye, V., Inoue, S. and Chang, F. (2001). A mechanism for nuclear positioning in fission yeast based on microtubule pushing. *J Cell Biol* **153**, 397-411.
- Vallen, E. A., Caviston, J. and Bi, E. (2000). Roles of Hof1p, Bni1p, Bnr1p, and myo1p in cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **11**, 593-611.
- Vavylonis, D., Wu, J. Q., Hao, S., O'Shaughnessy, B. and Pollard, T. D. (2008). Assembly mechanism of the contractile ring for cytokinesis by fission yeast. *Science* **319**, 97-100.
- Versele, M., Gullbrand, B., Shulewitz, M. J., Cid, V. J., Bahmanyar, S., Chen, R. E., Barth, P., Alber, T. and Thorner, J. (2004). Protein-protein interactions governing septin heteropentamer assembly and septin filament organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **15**, 4568-83.
- Versele, M. and Thorner, J. (2004). Septin collar formation in budding yeast requires GTP binding and direct phosphorylation by the PAK, Cla4. *J Cell Biol* **164**, 701-15.
- Vrabioiu, A. M. and Mitchison, T. J. (2006). Structural insights into yeast septin organization from polarized fluorescence microscopy. *Nature* **443**, 466-9.
- Vrabioiu, A. M. and Mitchison, T. J. (2007). Symmetry of septin hourglass and ring structures. *J Mol Biol* **372**, 37-49.
- Wachtler, V., Huang, Y., Karagiannis, J. and Balasubramanian, M. K. (2006). Cell cycle-dependent roles for the FCH-domain protein Cdc15p in formation of the actomyosin ring in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **17**, 3254-66.

-
- Weinzierl, G., Leveleki, L., Hassel, A., Kost, G., Wanner, G. and Bölker, M. (2002). Regulation of cell separation in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **45**, 219-31.
- Weirich, C. S., Erzberger, J. P. and Barral, Y. (2008). The septin family of GTPases: architecture and dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 478-89.
- Weiss, E. L., Bishop, A. C., Shokat, K. M. and Drubin, D. G. (2000). Chemical genetic analysis of the budding-yeast p21-activated kinase Cla4p. *Nature Cell Biology* **2**, 677-685.
- Witucki, L. A., Huang, X., Shah, K., Liu, Y., Kyin, S., Eck, M. J. and Shokat, K. M. (2002). Mutant tyrosine kinases with unnatural nucleotide specificity retain the structure and phospho-acceptor specificity of the wild-type enzyme. *Chem Biol* **9**, 25-33.
- Wu, J. Q., Kuhn, J. R., Kovar, D. R. and Pollard, T. D. (2003). Spatial and temporal pathway for assembly and constriction of the contractile ring in fission yeast cytokinesis. *Dev Cell* **5**, 723-34.
- Wu, J. Q., Sirotkin, V., Kovar, D. R., Lord, M., Beltzner, C. C., Kuhn, J. R. and Pollard, T. D. (2006). Assembly of the cytokinetic contractile ring from a broad band of nodes in fission yeast. *J Cell Biol* **174**, 391-402.
- Zhang, C., Kenski, D. M., Paulson, J. L., Bonshtien, A., Sessa, G., Cross, J. V., Templeton, D. J. and Shokat, K. M. (2005). A second-site suppressor strategy for chemical genetic analysis of diverse protein kinases. *Nat Methods* **2**, 435-41.
- Zhao, Y., Boguslawski, G., Zitomer, R. S. and DePaoli-Roach, A. A. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* homologs of mammalian B and B' subunits of protein phosphatase 2A direct the enzyme to distinct cellular functions. *J Biol Chem* **272**, 8256-62.

5 Anhang

5.2 Veröffentlichungen

Schriftliche Arbeiten:

Sandrock, B., Böhmer, C. and Bölker, M. (2006) Dual function of the germinal centre kinase Don3 during mitosis and cytokinesis in *Ustilago maydis*. Mol. Microbiol., 62, 655-666.

Böhmer, M., Colby, T., Böhmer, C., Bräutigam, A., Schmidt, J. and Bölker M. (2007) Proteomic analysis of dimorphic transition in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. Proteomics 7, 675-685.

Böhmer, C., Böhmer, M., Bölker, M. and Sandrock, B. (2008) Cdc42 and the Ste20-like kinase Don3 act independently in triggering cytokinesis in *Ustilago maydis*. J. Cell Sci., 121, 143-148.

Böhmer, C., Ripp, C. and Bölker, M. (2009) Dispersal of septin filaments during transition from collar to ring-like structures. Curr Biol., submitted

Böhmer, C., Schwenen H. and Bölker, M. (2009) The protein kinase Gin4 regulates compartmentalization of septin filaments and is required for septum positioning in *Ustilago maydis*. (in preparation)

Vorträge:

Böhmer, C., Sandrock B. and Bölker M. (2006) Cell polarity and bud-site selection in *Ustilago maydis*. "3rd International Ustilago Conference", Guanajuato

Böhmer, C. and Bölker M. (2008) Cdc15-triggered actomyosin ring contraction is essential for septin collar-to-ring transition in *U. maydis*. First German / French / European / Meeting "Yeast and Filamentous Fungi", Strasbourg

Böhmer, C. and Bölker M. (2008) Cdc15-triggered actomyosin ring contraction is essential for septin collar-to-ring transition in *U. maydis*, "4th International Ustilago Meeting" Rauischholzhausen

Böhmer, C. and Bölker M. (2008) Cdc15-triggered actomyosin ring contraction is essential for septin collar-to-ring transition in *U. maydis*. International Symposium "Intra- and Intercellular Transport and Communication", Marburg

Poster:

Böhmer, C., Sandrock, B. and Bölker M. (2006) Cell polarity and bud-site selection in *Ustilago maydis*. 1st Meeting "Biology of Yeasts and Filamentous Fungi", Frankfurt (Prämiert mit Posterpreis)

Böhmer, C., Sandrock, B. and Bölker M. (2007) Chemical genetics reveals that septin collar transition is triggered sequentially by Cdc42 and the Ste20-like kinase Don3 in *Ustilago maydis*. 8th VAAM-Symposium "Molecular Biology of Fungi", Hamburg (Prämiert mit Posterpreis)

Cell polarity and bud-site selection in *Ustilago maydis*

Christian Böhmer, Björn Sandrock and Michael Bölker
Department of Biology, University of Marburg, Karl-von-Frisch-Straße 8,
35032 Marburg-Germany, E-Mail: ChristianBoehmer@GMX.de



Introduction:

Little is known about the temporal order of budding in cells with bipolar bud-site selection, in particular it is not known whether subsequent buds appear at opposite poles in an alternating fashion or whether these sites are used just randomly. To study the regulation of cell polarity and bud-site selection in *Ustilago maydis* we used a genetically modified Don3 kinase that can be specifically inhibited by Na-PP1.

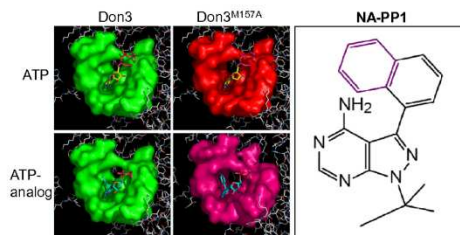


Figure 1

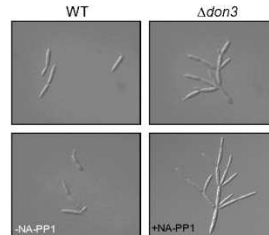


Figure 2

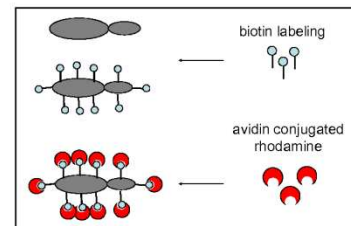


Figure 3

Chemical genetic approach

To study the function of the Don3 kinase we used a chemical genetic approach which has been developed by Kevan Shokat and colleagues [1]. To accommodate the specific binding of the ATP analogue NA-PP1 the methionine M157 of the ATP binding pocket was changed to alanine by site directed mutagenesis.

The Don3 cell separation defect

The Don3 kinase belongs to the germinal centre kinase (GCK) subfamily of Ste20-like kinases. Loss of Don3 activity results in a cell separation defect and in the generation of tree-like cell clusters [2]. The engineered kinase Don3^{M157A} can be used *in vivo* as molecular switch, to follow the sequential appearance of new buds on a single cell.

Specific labeling of cell surface proteins

Non-permeable Sulfo-NHS-LC-Biotin reacts efficiently with primary amino groups (-NH₂) of cell surface proteins. Biotin-labelled cells can be made visible by staining with avidin conjugated rhodamine, even hours after labelling process. This allowed us to follow labelled cells for several generation.

Bud-site selection in *Ustilago maydis* occurs randomly

In the absence of Don3 activity, newly formed daughter cells bud in a strictly monopolar pattern with buds occurring exclusively at the distal pole (Fig.4). In contrast, the mother cell (M) is able to bud in a bipolar pattern. Daughter cells (1-4) of these cells can be formed on both poles. We could demonstrate that the order of bud-site selection on the mother cell occurs randomly.

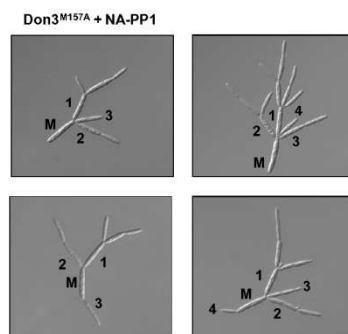


Figure 4

Block of cytokinesis is reversible

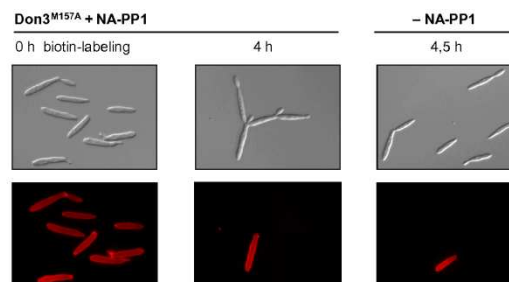


Figure 5

After four hours of incubation we could also observe cell clusters with mother cells whose oldest daughter cell was either partly or even completely labelled with biotin (Fig.6). This occurs because cell cultures consist of budding cells with buds in different sizes.

This shows that Don3 activity is required late in cell cycle and that the extension of new buds occurs strictly polar.

Don3 activity is required late in cell cycle

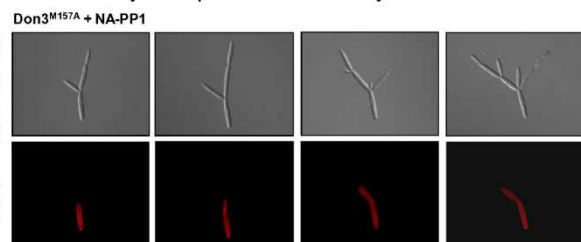


Figure 6

Conclusions:

The engineered version of Don3^{M157A} can be inhibited by addition of Na-PP1.
Cytokinesis can be rescued if inhibition of Don3 is reversed.
We could show that Don3 activity is required immediately before cell separation.
The order of bud-site selection in mother cells is randomly.

References:

- [1] Bishop, A. C., Buzko, O., Shokat, K. M. (2001). Magic bullets for protein kinases. *Trends in Cell Biology* 11, 167-172.
- [2] Weinzierl, G., Leveleki, L., Hassel, A., Kost, G., Wanner, G. and Bölker, M. (2002). Regulation of cell separation in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology* 45, 219-231

Chemical genetics reveals that septin collar transition is triggered sequentially by Cdc42 and the Ste20-like kinase Don3 in *Ustilago maydis*

Christian Böhmer, Björn Sandrock and Michael Bölker

Department of Biology, University of Marburg, Karl-von-Frisch-Straße 8,
35032 Marburg-Germany, E-Mail: ChristianBoehmer@GMX.de

Introduction:

For successful completion of cytokinesis, the formation of a septin collar and its transition to a ring-like structure is necessary, in both fungi and animal cells. Little is known about how this transition from a collar to a ring-like structure occurs. To study the function of Cdc42 and the Ste20-like kinase Don3 in this process in *Ustilago maydis* we used a genetically modified Don3 kinase that can be specifically inhibited by NA-PP1.

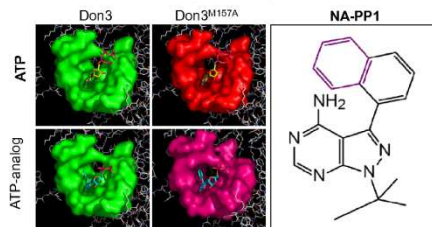


Figure 1

Chemical genetic approach

To study the function of the Don3 kinase we used a chemical genetic approach which has been developed by Kevan Shokat and colleagues. To accommodate the specific binding of the ATP analogue NA-PP1 the methionine M157 of the ATP binding pocket was changed to alanine by site directed mutagenesis.

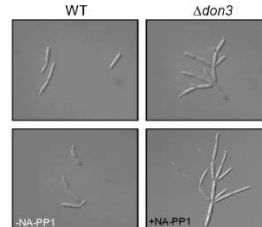


Figure 2

Don3/Cdc42 cell separation mutants

The Don3 kinase belongs to the germinal centre kinase (GCK) subfamily of Ste20-like kinases. Loss of Don3 activity results in a cell separation defect and in the generation of tree-like cell clusters. The engineered kinase Don3^{M157A} can be used *in vivo* as molecular switch, to follow the sequential appearance of new buds on a single cell. Interestingly the deletion of the small GTPase Cdc42 shows the same separation defect. The interplay between both proteins is unknown.

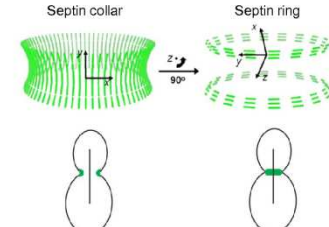


Figure 3

The septin collar to ring transition

A diagram of the septin filament rotation during the collar to ring transition is shown (upper part). Notice the ring filament inclination due to the corresponding cell membrane inclination. In the lower part the structure of septin filaments in the mother-bud region of *S. cerevisiae* budding cells are shown. The collar (left) is illustrated as two separate dots, the ring-like structure (right) as continuous line.

Results:

Sequential inhibition and activation of Don3M157A and Cdc42

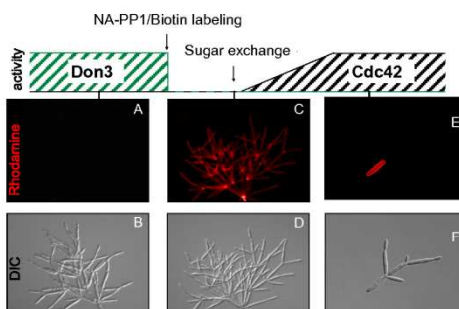


Figure 4: To study the functional interaction between Don3 and Cdc42, during cell separation we introduced the analogue-sensitive Don3^{M157A} kinase into the conditional *Porg::cdc42* mutant strain. Cells were grown in *Porg* repressing medium and displayed a cell separation defect due to the absence of Cdc42 (A and B). We labelled the cell clusters with NHS-LC-Biotin and kinase activity of Don3^{M157A} was blocked by addition of NA-PP1 (C and D). Expression of Cdc42 was induced 90 minutes after inhibition of Don3^{M157A} by a sugar exchange and cell clusters gradually disintegrated into single labelled cells (E and F). In these cells cytokinesis was obviously completed by Cdc42 although Don3 kinase activity was inhibited by NA-PP1. Therefore, we assume that Don3 phosphorylates a yet unknown target, which may act as landmark protein which then serve as platform for Don3/Cdc42-triggered initiation of the secondary septum.

Conclusions:

The engineered version of Don3^{M157A} can be inhibited by NA-PP1.

Cytokinesis in *U. maydis* involves the sequential formation of two independent cytokinetic contractile rings

Don3 protein kinase activity is needed for both actomyosin ring assembly and septin collar transition.

Don3 and Cdc42 act independently during septum initiation.

Cdc15-GFP as contractile actomyosin ring marker

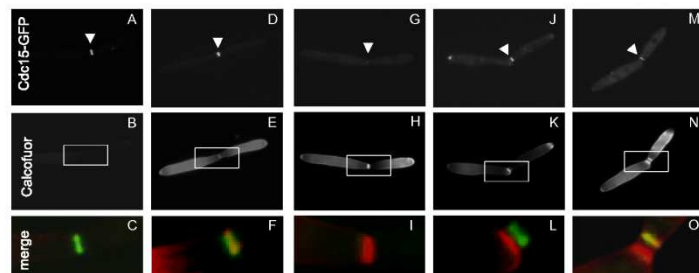


Figure 5: The *U. maydis* Cdc15 protein is highly similar to the *S. pombe* septation protein Cdc15, which coordinates the assembly of the cytokinetic contractile ring in fission yeast. During division of *U. maydis* wild type cells, Cdc15-GFP is visible in a ring-like structure at the mother-bud neck (A-F) and disappeared after completion of the first septum (G, H and I). Intriguingly, shortly afterwards Cdc15-GFP reappeared as a ring-like structure at the daughter side of the primary septum (J, K and L) and vanished again after completion of the secondary septum (M, N and O). Thus, cytokinesis in *U. maydis* involves the sequential formation of two independent cytokinetic contractile rings. Notice calcofluor stains fresh synthesized chitin.

Septin collar transition is triggered by Don3

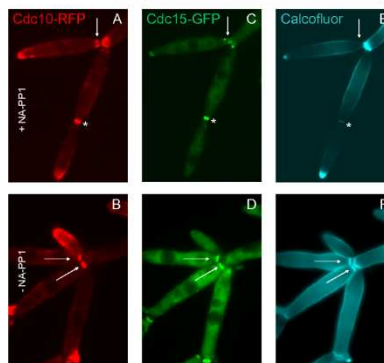


Figure 6: We followed the transition of the septin collar and the formation of a contractile actomyosin ring by expressing fluorescent fusion proteins of Cdc10 and Cdc15 in a Don3^{M157A} analogue-sensitive strain. In cells without Don3 activity, primary septin transition, actomyosin ring assembly and septum formation occurred (A, C and E stars). In contrast we could observe in these cells the formation of a septin-collar at the expected site of secondary septum formation but not its transition to a ring-like structure (A and E arrows). In addition the assembly of the secondary actomyosin ring was inhibited (C arrow). After the release of the inhibitor we could observe the transition of the septin-collar to a ring-like structure (B arrows) which was required for the assembly of the actomyosin ring (D arrows) and for secondary septum formation (F arrows).

5.3 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Septin- und Aktomyosindynamik während der Zellteilung von *Ustilago maydis*“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, 27.01.2009

Christian Böhmer

Erklärung des Eigenanteils

Böhmer, C., Böhmer, M., Bölker, M. and Sandrock, B. (2008) Cdc42 and the Ste20-like kinase Don3 act independently in triggering cytokinesis in *Ustilago maydis*. J. Cell Sci., 121, 143-148.

Alle Versuche wurden von C.B. durchgeführt. Die Veröffentlichung wurde von B.S., M. Bölker und C.B. geschrieben. Die analog-sensitive Version der Don3 Kinase wurde bereits während der Diplomarbeit von C.B. erzeugt. Die Position des Aminosäureaustausches wurde dabei von M. Böhmer bestimmt.

Böhmer, C., Ripp, C. and Bölker, M. (2009) Dispersal of septin filaments during transition from collar to ring-like structures. Curr Biol., submitted

Alle Versuche wurden von C.B. entworfen und durchgeführt. Die Herstellung des Cdc15-Deletionskonstrukts war Bestandteil der von C.B. betreuten Bachelorarbeit von C.R. Die Veröffentlichung wurde von M.B. und C.B. geschrieben.

Böhmer, C., Schwenen H. and Bölker, M. (2009) The protein kinase Gin4 regulates compartmentalization of septin filaments and is required for septum positioning in *Ustilago maydis*. (in preparation)

Alle Versuche wurden von C.B. entworfen und durchgeführt. Teile der Ergebnisse waren bereits Bestandteil der von C.B. betreuten Bachelorarbeit von H.S. M.B. und C.B. schreiben das Manuskript.

Marburg, 27.01.2009

Christian Böhmer